



EESTI MAAÜLIKOOL

Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut

Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool

**Maarja Abel**

**TEESEENE LÜOFILISEERIMINE JA LÜOFILISEERITUD  
TEESEENE KASUTAMINE *KOMBUCHA*  
STARTERKULTUURINA**

LYOPHILIZATION OF TEA FUNGUS AND USE OF  
LYOPHILIZED TEA FUNGUS AS KOMBUCHA STARTER  
CULTURE

Magistritöö

Toiduainete tehnoloogia õppekava

Juhendaja: nooremprofessor Helena Andreson, PhD

Tartu 2021

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Magistritöö lühikokkuvõte	
Autor: Maarja Abel		Õppekava: Toiduainete tehnoloogia	
Pealkiri: Teeseene lüofiliseerimine ja lüofiliseeritud teeseene kasutamine <i>kombucha</i> starterkultuurina			
Lehekülgi: 75	Jooniseid: 5	Tabeleid: 11	Lisasid: 1
Osakond / Õppetool: Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 1.7. Toiduteadused, Toiduainete ja jookide tehnoloogia T430 Juhendaja(d): nooremprofessor Helena Andreson Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2021			
<p><i>Kombucha</i> jooki toodetakse ja tarbitakse aina enam, aga endiselt ei ole välja töötatud teeseene asemel starterkultuuri, mida oleks lihtsam säilitada, transportida ja doseerida. Kuna üksikutest mikroobidest valmistatud starterkultuuri abil ei ole võimalik saada autentsete omadustega <i>kombucha</i> jooki, siis võiks starterkultuuri valmistada lüofiliseeritud teeseenest.</p> <p>Magistritöö eesmärk on anda ülevaade teeseene süsteemist, selles esinevatest mikroobidest ja nendevahelistest suhetest, mikroobide ja bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimisest ning selgitada, kas ja kuidas mõjutab teeseene lüofiliseerimine selle kasutamist <i>kombucha</i> starterkultuurina.</p> <p>Lüofiliseeritud teeseene efektiivsuse hindamiseks starterkultuurina määrati bakterite, äädikhappebakterite ja pärmseente arvukus teeseenes, lüofiliseeritud teeseeneproovides ja lüofiliseeritud teeseente abil 14 päeva kääritatud jookides ning vaadeldi kääritatud jookide väliseid omadusi. Kõigis katseetappides kirjeldati isoleeritud mikroobide morfoloogiat ja identifitseeriti isoleeritud mikroobid. Lisaks uuriti erinevate krüoprotektorite (sahharoos, glükoos, galaktoos) mõju teeseenes esinevatele mikroobidele.</p> <p>Teeseene lüofiliseerimisel oli efektiivseim krüoprotektor sahharoos. Lüofiliseeritud teeseene mikroobide arvukus oli madalam (<math>p &lt; 0,05</math>) kui algmaterjalisis ehk tavalises teeseenes, kuid lüofiliseeritud teeseene abil kääritatud jookides osutus mikroobide arvukus kõrgemaks kui lüofiliseeritud proovides. Tulemustest järeldus, et mikroobide elujõulisus võis taastuda pärast lüofiliseerimisprotsessi. Kuna lüofiliseeritud teeseeneproovidega kääritatud jookides puudusid käärimise tunnused, siis jõuti selgusele, et lüofiliseeritud teeseen ei ole piisavalt efektiivne <i>kombucha</i> starterkultuurina kasutamiseks.</p> <p>Erinevates katseetappides õnnestus proovidest isoleerida ja identifitseerida vähe mikroobe, identifitseeritud mikroobide liigid olid varieeruvad ning selle tõttu ei ole identifitseerimistulemuste põhjal võimalik hinnata lüofiliseeritud teeseene kasutamise võimalikkust starterkultuurina.</p> <p>Töö raames kogutud andmeid ja uusi teadmisi saab kasutada tulevastes uurimistöodes <i>kombucha</i> starterkultuuri väljatöötamiseks.</p>			
Märksõnad: teeseene süsteem, bakteriaalne tselluloos, lüofiliseerimisprotsess, starterkultuur			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Maarja Abel		Curriculum: Food technology	
Title: Lyophilization of tea fungus and use of lyophilized tea fungus as kombucha starter culture			
Pages: 75	Figures: 5	Tables: 11	Appendixes: 1
Department / Chair: Chair of Food Science and Technology Field of research and (CERC S) code: 1.7. Food Sciences, Food and drink technology T430 Supervisors: assistant professor Helena Andreson Place and date: Tartu 2021			
<p>Kombucha is increasingly being produced and consumed, but yet no alternative starter culture to tea fungus (SCOBY) that is easier to store, transport and dose has been developed. Since it is not possible to obtain a kombucha drink with authentic properties using a starter culture produced of individual microbes, the starter culture could be prepared from lyophilized SCOBY.</p> <p>The aim of this Master's thesis is to give an overview of the SCOBY system, its microbes and their relationship to each other, lyophilization of microbes and bacterial cellulose, and to determine whether and how the lyophilization of SCOBY can influence its use as a starter culture of kombucha.</p> <p>To evaluate the efficacy of lyophilized SCOBY as a starter culture, the number of bacteria, acetic acid bacteria and yeasts in the SCOBY, lyophilized SCOBY and beverages fermented by lyophilized SCOBYs for 14 days was determined and the external properties of fermented beverages were observed. In all experimental steps, the morphology of the isolated microbes was described and the isolated microbes were identified. In addition, the effect of different cryoprotectants (sucrose, glucose, galactose) on microbes in SCOBY was studied.</p> <p>Sucrose proved to be the most effective cryoprotectant for lyophilization of SCOBY. The microbial count in lyophilized SCOBY was lower (<math>p &lt; 0,05</math>) than that of the SCOBY, but the number of microbes was higher in beverages fermented by lyophilized SCOBY than in the lyophilized samples. The results showed that microbial viability could be restored after the lyophilization process. As beverages fermented by lyophilized SCOBY samples did not show fermentation characteristics, it was concluded that lyophilized SCOBY was not effective enough to be used as a starter culture for kombucha.</p> <p>In the various experimental stages, only few microbes were isolated and identified from the samples, also the species of microbes identified varied, and therefore the possibility of using lyophilized SCOBY as a starter culture cannot be assessed on the basis of these identification results.</p> <p>However, the data and new knowledge gathered in the work can be used in future research to develop a kombucha starter culture.</p> <p>Keywords: SCOBY system, bacterial cellulose, lyophilization process, starter culture</p>			

# SISUKORD

LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ANALÜÜS .....	7
1.1. Teeseen ja <i>kombucha</i> .....	7
1.1.1. <i>Kombucha</i> tootmise tehnoloogia .....	7
1.2. Teeseene ja <i>kombucha</i> mikrobiota .....	8
1.2.1. <i>Komagataeibacter xylinus</i> .....	12
1.2.2. <i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i> .....	13
1.2.3. Mikroobide roll <i>kombucha</i> fermentatsiooniprotsessis.....	14
1.2.4. Mikroobide vastastikune mõju teeseene süsteemis .....	15
1.3. Lüofiliseerimisprotsess.....	17
1.3.1. Mikroobide lüofiliseerimine.....	18
1.3.2. Suspensiooni keskkond .....	21
1.3.2.1. Krioprotektorid .....	21
1.3.3. Äädikhappebakterite lüofiliseerimine .....	23
1.3.4. Pärmseente lüofiliseerimine .....	25
1.3.5. Bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimine .....	26
1.4. Kirjanduse analüüsi kokkuvõte .....	27
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	29
2.1. Eesmärk ja ülesanded .....	29
2.2. Materjal ja meetodika.....	29
2.2.1. Uuritav materjal.....	29
2.2.2. Proovide lüofiliseerimiseelne ettevalmistamine .....	29
2.2.3. Musta tee lahuse valmistamine.....	31
2.2.4. Lüofiliseeritud proovidest <i>kombucha</i> joogi valmistamine .....	31
2.2.5. Ettevalmistused mikrobioloogilisteks külvideks.....	33
2.2.6. Mikrobioloogilised külvid .....	33
2.2.7. Mikroobide üldarvu määramine ja morfoloogia kirjeldamine .....	34
2.2.8. pH väärtuse määramine .....	35
2.2.9. Mikroobide identifitseerimine MALDI-TOF meetodil .....	35
2.2.10. Pärmseente identifitseerimine API kit meetodil.....	35
2.2.11. Tulemuste statistiline analüüs .....	36
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	37
3.1. Mikroobide arvukus algmaterjalis ja lüofiliseeritud proovides .....	37
3.2. Mikroobide arvukus lüofiliseeritud teeseenest valmistatud jookides.....	40
3.3. Pärmseente identifitseerimine ja morfoloogia.....	44
3.4. Äädikhappebakterite identifitseerimine ja morfoloogia .....	46
KOKKUVÕTE.....	49
KASUTATUD KIRJANDUS .....	51
LISAD .....	61
Lisa 1. M. Abel'i bakalaureusetöö põhjal magistriõpingute raames avaldatud artikkel .....	62

## LÜHENDID

14-GA	lüofiliseeritud teeseene (krüoprotektorina kasutati galaktoosi) abil 14 päeva kääritatud jook
14-GL	lüofiliseeritud teeseene (krüoprotektorina kasutati glükoosi) abil 14 päeva kääritatud jook
14-K	lüofiliseeritud teeseene (krüoprotektorita) abil 14 päeva kääritatud jook
14-S	lüofiliseeritud teeseene (krüoprotektorina kasutati sahharoosi) abil 14 päeva kääritatud jook
14-TS	<i>kombucha</i> , lüofiliseeritud teeseene abil 14 päeva kääritatud jookide kontrollproov
AM	algmaterjal ehk tavaline teeseen
DMSO	dimetüülsulfoksiid
füs. l.	füsioloogiline lahus
GYCA	<i>Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Agar</i> sööde
KS	katseseeria
L-GA	lüofiliseeritud teeseene proov, millele lisati krüoprotektorina galaktoos
L-GL	lüofiliseeritud teeseene proov, millele lisati krüoprotektorina glükoos
L-K	lüofiliseeritud teeseene proov, millele ei lisatud krüoprotektorit
L-S	lüofiliseeritud teeseene proov, millele lisati krüoprotektorina sahharoos
MPCA	<i>Milk Plate Count Agar</i> sööde
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> sööde

## SISSEJUHATUS

*Kombucha* jooki on valmistatud ja tarvitatud tuhandeid aastaid, sest arvatakse, et jook avaldab tervisele kasulikku mõju. Ka praegusel ajal valmistatakse *kombucha*'t üha enam nii kodustes tingimustes kui ka tööstuslikult. Tavaliselt kasutatakse *kombucha* tootmiseks vajaliku fermentatsiooniprotsessi alustamiseks teeseent, aga selle asemel võiks kasutada näiteks lüofiliseerimisprotsessi abil saadud starterkultuuri, sest sellisel viisil valmistatud starterkultuuri oleks lihtsam transportida, hoiustada ja doseerida. Kui starterkultuur koosneb selekteeritud ja kontrollitud mikroobidest, on saadav toode ka tarbija jaoks ohutum. Üksikute valitud mikroobide kasutamise puudus on aga see, et saadaval joogil ei ole kõiki selliseid omadusi, mis on klassikalisel *kombucha*'l, sest teeseenes on mikroobe väga palju ning igaühel neist on fermentatsiooniprotsessis oma kindel roll. Sellest lähtuvalt võiks uurida lüofiliseeritud teeseenest starterkultuuri väljatöötamise võimalust, sest nii säiliks starterkultuuris suurem osa teeseenes esinevatest mikroobidest.

Magistritöö eesmärk on anda ülevaade teeseene süsteemist, selles esinevatest mikroobidest ja nendevahelistest suhetest, mikroobide ja bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimisest ning selgitada, kas ja kuidas mõjutab teeseene lüofiliseerimine selle kasutamist *kombucha* starterkultuurina.

Magistritöö kirjanduse analüüsi osas esitatakse ülevaade teeseene ja *kombucha* ajaloost, *kombucha* tootmise tehnoloogiast, teeseene süsteemi mikrobioloogilisest koostisest, mikroobidevahelistest suhetest teeseene süsteemis, kirjeldatakse lüofiliseerimise metoodikat ning äädikhappebakterite, pärmseente ja bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimise võimalusi. Eksperimentaalse osa raames selgitati, kas teeseent on võimalik lüofiliseerida ning uuriti lüofiliseeritud teeseene kasutamise võimalust *kombucha* starterkultuurina. Lüofiliseeritud teeseene kui starterkultuuri efektiivsuse hindamiseks määrati nii algmaterjalist ehk teeseenest, lüofiliseeritud proovidest kui ka 14 päeva kääritatud teelahustest bakterite, äädikhappebakterite ja pärmseente arvukus ning vaadeldi kääritatud jookide väliseid omadusi. Lisaks kirjeldati söötmetassidele kasvanud mikroobide morfoloogiat ja identifitseeriti erinevates protsessi etappides isoleeritud mikroobid.

# 1. KIRJANDUSE ANALÜÜS

## 1.1. Teeseen ja kombucha

Teeseen (botaanilise nimega *Medusomyces gisevii*) ja *kombucha* moodustavad ühtse süsteemi (teeseene süsteem), mis koosneb äädikhappebakteritest, piimhappebakteritest ja pärmseentest, kes elavad sümbioosis (Jayabalan jt. 2010, Coton jt. 2017). Teeseent kasvatatakse suhkruga rikastatud teelahuses, milles sahharoos on mikroobidele süsinikuallikaks ja tee on lämmastikuallikaks (Jayabalan jt. 2010, Velicanski jt. 2013, Al-Kalifawi, Hassan 2014). Suhkru ja tee lahuse fermentatsiooniprotsess viiakse läbi teeseenes leiduvate mikroobide abil (Coton jt. 2017). Fermentatsiooni tulemusena saadakse *kombucha* jook, mis sisaldab orgaanilisi happeid, mineraalaineid, vitamiine, aminohappeid, polüfenoole jt. ühendeid (Zubaidah jt. 2018, Jakubczyk jt. 2020, Mousavi jt. 2020).

Teeseen ja *kombucha* pärinevad Kirde-Hiinast endisest Mandžuuria piirkonnast (Cvetković jt. 2019). Kui kaubateed laienesid Kaug-Idast kaugemale, siis jõudis jook ka Ida-Euroopasse (sh. Venemaale) (Greenwalt jt. 2000, Cvetković jt. 2019). *Kombucha* tarvitamine ja sellega kaubitsemine muutusid Euroopas väga populaarseks, aga kui II maailmasõja ajal tekkis suhkru ja tee puudus, ei olnud jooki enam võimalik valmistada. *Kombucha* järele oli suur nõudlus kuni 1950. aastateni, mil hakkasid levima kuulujutud joogi toksilisusest. Pärast seda *kombucha* tarbimine vähenes. (Dutta, Paul 2019) Viimase kahe aastakümne jooksul on *kombucha* oma populaarsuse taastanud ning joogi tootmine on märkimisväärselt suurenenud, eriti Põhja-Ameerikas ja Euroopas (Cvetović jt. 2019, Dutta, Paul 2019).

### 1.1.1. *Kombucha* tootmise tehnoloogia

*Kombucha* tootmistehnoloogia esimene etapp on teelahuse valmistamine. Lahuse valmistamiseks kaalutakse vajalik kogus teed ning sellele lisatakse kuum keedetud vesi. *Kombucha* tootmisprotsessis kasutatakse tavaliselt musta teed, aga võimalik on kasutada ka teisi tee liike (nt. roheline, valge, punane ja oolong tee) ja teetaimi (salvei, piparmünt,

sidrunmeliss) (Leal jt. 2018, Jakubczyk jt. 2020, Kayisoglu, Coskun 2020). Seejärel lisatakse teelahusesse süsinikuallikas, milleks on tavaliselt sahharoos. Erinevate autorite poolt on teadusuuringutes kasutatud sahharoosi asemel ka näiteks kookospalmisuhkrut ja melassi (Hussin jt. 2015, Muhialdin jt. 2019).

Saadud lahus jahutatakse toatemperatuurile ehk fermentatsiooniprotsessi algtemperatuurile (20-30 °C) (Kumar, Joshi 2016, Mousavi jt. 2020). Aktiivhappesuse (pH) langetamise ja seeläbi võõrmikroobide kasvu inhibeerimise eesmärgil võib tee sisse lisada ka eelmisest fermentatsioonist pärinevat *kombucha*'t (Greenwalt jt. 2000, Teoh jt. 2004, Malbaša jt. 2005, Dutta, Paul 2019). Fermentatsiooniprotsessi alustamiseks lisatakse lahusesse teeseen ning teeseent sisaldav anum kaetakse paberi, riide või muu sobiva materjaliga, et takistada putukate ja mikroobide sattumist joogi sisse. Seejuures peab kasutatav kate võimaldama gaasivahetuse ümbritseva keskkonna ja teeseene süsteemi vahel, sest teeseenes leiduvad mikroobid vajavad elutegevuseks aeroobseid tingimusi ning anumast on vaja eemaldada fermentatsiooni käigus eralduv CO<sub>2</sub> (Dutta, Paul 2019). Fermentatsioon viiakse läbi 7-14 päeva jooksul (Kumar, Joshi 2016, Jakubczyk jt. 2020) valgustatud või pimedas ruumis. Fermentatsiooniprotsessi tulemusena saadakse *kombucha* jook ning nn. emateeseene kohale moodustub uus teeseen (teeseene tüetarkultuur), mida saab kasutada järgnevates fermentatsiooniprotsessides (Dutta, Paul 2019).

Heade sensorsete omadustega *kombucha* saamiseks on soovitatav lõpetada fermentatsiooniprotsess siis, kui joogi tiitritav happesus on 44,5 g/l (Velicanski jt. 2013). Tööstuslikul tootmisel *kombucha* filtreeritakse, villitakse pudelitesse ja säilitatakse 4 °C juures (Dutta, Paul 2019, Tran jt. 2020a).

## **1.2. Teeseene ja *kombucha* mikrobiota**

Teeseen ja *kombucha* koosnevad peamiselt äädikhappebakteritest, pärmseentest ning vähesel määral piimhappebakteritest. Äädikhappebakterid on aeroobsed mikroobid, kes on võimelised kasutama alkoholi, et toota äädikhapet (Villarreal-Soto jt. 2018). Äädikhappebakterite poolt toodetud orgaanilised happed annavad *kombucha*'le iseloomuliku hapu maitse ning äädikhape avaldab mõju joogi lõhnale (Tran jt. 2020b).



Teeseene süsteemi kuuluvad äädikhappebakterid (tabel 1) on liikuvad, gramnegatiivsed ja paindunud varda kujuga (Ali, Shivanna 2017).

**Tabel 1.** Teeseenest ja *kombucha*'st isoleeritud äädikhappebakterite perekonnad

Perekond	Kirjanduse allikad
<i>Acetobacter</i>	Jayabalan jt. 2010, Marsh jt. 2014, Coton jt. 2017, Filippis jt. 2018, Tran jt. 2020a
<i>Bacterium</i>	Yapar jt. 2010
<i>Gluconacetobacter</i>	Yang jt. 2010, Marsh jt. 2014, Reva jt. 2015, Coton jt. 2017, Filippis jt. 2018
<i>Gluconobacter</i>	Reva jt. 2015, Coton jt. 2017, Gaggia jt. 2019
<i>Halomonas</i>	Reva jt. 2015
<i>Herbaspirillum</i>	Reva jt. 2015
<i>Komagataeibacter</i>	Santos jt. 2014, Reva jt. 2015, Chakravorty jt. 2016, Mukadam jt. 2016, Coton jt. 2017, Gaggia jt. 2019, Tran jt. 2020a

Kõige olulisem äädikhappebakter teeseene süsteemis on *Komagataeibacter xylinus*, kes sünteesib fermentatsiooni käigus tselluloosi (Jayabalan jt. 2010). Tselluloos moodustub kasvulahuse pinnale esialgu õhukese kihina, kui väiksed bakterite poolt sünteesitud tselluloosiniidid kerkivad lahuse pinnale ja koonduvad kokku (May jt. 2019). Moodustunud tselluloosikile külge kinnituvad ka teiste bakterite ja pärmseente rakud (Jayabalan jt. 2010). Tselluloos muutub fermentatsiooniprotsessi käigus suuremaks ja tugevamaks ning sageli moodustub mitu teeseene kihti, mis on üksteisega ühendatud filamentide abil (May jt. 2019) (joonis 1).



**Joonis 1.** Teeseen ja *kombucha*.

Teeseene ja *kombucha* koostisesse kuuluvad pärmseened (tabel 2) on peamiselt osmotolerantsed, fermenteerivad ning võimelised tootma happeid (Teoh jt. 2004). Pärmid avaldavad mõju saadava *kombucha* joogi sensorsetele omadustele. Mida rohkem on teeseenes pärme, seda happelisem valmistoode saadakse (Markov jt. 2006). Arvatakse, et pärmseened võivad samuti aidata kaasa tselluloosi moodustumisele, sest on leitud, et ka pärmidel on võime sünteesida tselluloosi (May jt. 2019). Teeseenele iseloomulik pärmseen on näiteks *Zygosaccharomyces kombuchaensis* sp. n. (tüüptüvi NRRL YB-4811, CBS 8849), kelle esmakordselt isoleerisid teeseenest Kurtzman jt. (2001).

**Tabel 2.** Teeseenest ja *kombucha*'st isoleeritud pärmseente perekonnad

Perekond	Kirjanduse allikad
<i>Brettanomyces</i>	Teoh jt. 2004, Jayabalan jt. 2010, Gaggia jt. 2019, Tran jt. 2020a
<i>Candida</i>	Teoh jt. 2004, Ramadani, Abulreesh 2010, Chakravorty jt. 2016, Coton jt. 2017
<i>Davidiella</i>	Marsh jt. 2014
<i>Debaryomyces</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Dekkera</i>	Marsh jt. 2014, Reva jt. 2015, Coton jt. 2017, Gaggia jt. 2019
<i>Eremothecium</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Galactomyces</i>	Tran jt. 2020a
<i>Hanseniaspora</i>	Chakravorty jt. 2016, Coton jt. 2017, Tran jt. 2020a
<i>Kazachstania</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Kluyveromyces</i>	Marsh jt. 2014, Chakravorty jt. 2016
<i>Lachancea</i>	Marsh jt. 2014, Chakravorty jt. 2016
<i>Leucosporidiella</i>	Marsh jt. 2014
<i>Merimbla</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Meyerozyma</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Naumovozyma</i>	Marsh jt. 2014
<i>Pichia</i>	Marsh jt. 2014, Coton jt. 2017
<i>Rhodotorula</i>	Teoh jt. 2004
<i>Saccharomyces</i>	Malbaša jt. 2008, Chakravorty jt. 2016, Coton jt. 2017, Tran jt. 2020a
<i>Saccharomycodes</i>	Malbaša jt. 2008, Ramadani, Abulreesh 2010
<i>Saccharomycopsis</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Schizosaccharomyces</i>	Teoh jt. 2004
<i>Sporopachydermia</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Starmera</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Sugiyamaella</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Zygosaccharomyces</i>	Kurtzman jt. 2001, Teoh jt. 2004, Marsh jt. 2014, Mukadam jt. 2016, Jayabalan jt. 2010, Marsh jt. 2014, Coton jt. 2017, Gaggia jt. 2019
<i>Zygotorulaspora</i>	Coton jt. 2017
<i>Zygowilliopsis</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Pichia</i>	Yapar jt. 2010, Chakravorty jt. 2016, Reva jt. 2015, Coton jt. 2017, Tran jt. 2020a
<i>Torulaspora</i>	Teoh jt. 2004
<i>Waitea</i>	Chakravorty jt. 2016
<i>Wallemia</i>	Marsh jt. 2014

Teeseene süsteemis on piimhappebaktereid tavaliselt vähe või neid ei ole üldse (Gramza-Michałowska jt. 2016, Filippis jt. 2018, Laureys jt. 2020). Filippis jt. (2018) leidsid, et piimhappebakterid esinesid proovides ainult siis, kui kasutati kõrgemat fermentatsioonitemperatuuri (30 °C). Marsh jt. (2014) uurimuses olid laktobatsillid kõige aktiivsemad käärimise viimastel etappidel. Coton jt. (2017) jõudsid järeldusele, et piimhappebakterid olid domineerivad rohelise tee baasil valmistatud *kombucha* jookides ja rohelises tees kasvatatud teeseentes. Mustas tees läbi viidud fermentatsiooniprotsessides on olnud domineerivaks äädikhappebakterid (Coton jt. 2017). Teeseene süsteemist on isoleeritud piimhappebakterid perekondadest *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oenococcus* ja *Streptococcus* (Marsh jt. 2014, Chakravorty jt. 2016, Coton jt. 2017, Filippis jt. 2018).

Lisaks on teeseene süsteemist leitud mikroobe perekondadest *Allobaculum*, *Collinsella*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Thermus* ja *Weissella* (Marsh jt. 2014, Chakravorty jt. 2016, Filippis jt. 2018). Nimetatud mikroobe on proovides tuvastatud vaid vähesel määral. Nii Marsh jt. (2014) kui ka Chakravorty jt. (2016) arvasid, et mikroobid, keda tavaliselt teeseenes ega *kombucha* joogis ei esine (nt. perekonnad *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Enterobacter*, *Propionibacterium* ja *Weissella*), võisid sattuda teeseene süsteemi kehvade sanitaartingimuste tõttu. Bifidobakterite ja propioonbakterite vähene arvukus ning nende puudumine kümnendal fermentatsioonipäeval viitasid sellele, et need mikroobid ei kuulu teeseene süsteemi (Marsh jt. 2014).

### **1.2.1. *Komagataeibacter xylinus***

*K. xylinus* on pulgakujuline gramnegatiivne katalaaspositiivne oksüdaasnegatiivne obligaatne aeroob, keda leidub näiteks äädikas, puuviljades, köögiviljades ja teeseenes (Chawla jt. 2009, Jayabalan jt. 2010, Rangaswamy jt. 2015, Lavasani jt. 2017). On näidatud, et *K. xylinus* B-12068 kasvuks optimaalne pH jääb vahemikku 3,5-4,5 ning optimaalne kasvutemperatuur on 28-30 °C. *K. xylinus* B-12068 rasvhapete koostises on domineerivaks palmitiin-, steariin- ja *cis*-vaktseenhape ning antud mikroobi tüvi kasutab süsinikuallikatena glükoosi, sahharoosi, fruktoosi ja maltoosi. (Prudnikova, Shidlovsky 2017, Volova jt. 2018)

Prudnikova ja Shidlovsky (2017) kirjeldasid oma töös *K. xylinus* B-12068 morfoloogiat: *Hestrin-Schramm* söötmel olid *K. xylinus*'e pesad väiksed, kumerad, läbipaistmatud ja kahvatud; bakteri rakud olid gramnegatiivsed, vardakujulised, mitte-liikuvad, paiknesid üksikult või paarides ning olid suurusega  $0,4-0,6 \times 1-1,5 \mu\text{m}$ .

*K. xylinus* on võimeline tootma kahte erinevat tüüpi tselluloosi. Tavaliselt toodab *K. xylinus* tselluloos I allomorfi, aga mikroob on võimeline tootma ka tselluloos II vormi 2,6-dikloro bensonitriili juuresolekul (Yu, Atalla 1996). *K. xylinus*'e poolt sünteesitav tselluloos koosneb kiududest, mille paksus on 3-4 nm ja laius on 70-80 nm (Chawla jt. 2009). Staatilistes tingimustes sünteesib mikroob tselluloosi vedeliku ja õhu piirpinnale ühtlase kihina, aga mittestaatilistes tingimustes on moodustuv tselluloos sfäärilise kujuga ning esineb filamentide ja kiududena (Rühs jt. 2018, Volova jt. 2018).

### 1.2.2. *Zygosaccharomyces kombuchaensis*

*Z. kombuchaensis* on teeseenest isoleeritud askospoore moodustav pärmseen, keda teadaolevalt mujalt ei ole leitud (Kurtzman jt. 2001). Mikroob on vastupidav äädikhappe suhtes, aga tundlik sorbiin- ja bensoehappe suhtes (Steels jt. 2002). *Z. kombuchaensis* on võimeline kasvama madalatel temperatuuridel, talub madalat pH-d ja kõrget suhkrusisaldust (Kurtzman jt. 2001, Steels jt. 2002). Oksüdatiivse stressi ja kõrgete temperatuuride suhtes on aga mikroob tundlik (Steels jt. 2002).

Kurtzman jt. (2001) poolt läbi viidud eksperimendi käigus kasvasid 5% linnaseekstrakti söötmel *Z. kombuchaensis*'e pesad, mis olid valged kuni kollakasvalged ja tuhmid kuni poolläikivad; rakud olid kerakujulised (läbimõõduga  $3,2-7,5 \mu\text{m}$ ) kuni ellipsoidsed ( $3-6,7 \times 3,8-8,7 \mu\text{m}$ ) ning paiknesid üksikult, paaris ja väikestes kobarates.

Steels jt. (2012) jõudsid järeldusele, et *Z. kombuchaensis* on *Zygosaccharomyces lentus*'e lähisugulane. Nimetatud mikroobidel on mitmeid ühiseid jooni: mõlemad mikroobid kasvavad temperatuuril  $4^\circ\text{C}$ , on tundlikud kuumuse ja oksüdatiivse stressi suhtes ega kasva temperatuuril üle  $25^\circ\text{C}$  aeroobsetes mittestaatilistes tingimustes; mõlemad on aeglase kasvuga – *Z. kombuchaensis*'e pooldumisaeg on 8,5-10,5 h ja *Z. lentus*'e pooldumisaeg on 10,2- ... h, samas kui *Zygosaccharomyces bailii* pooldumisaeg on vaid 2,3-2,5 h (Steels jt. 2001).

### 1.2.3. Mikroobide roll *kombucha* fermentatsiooniprotsessis

*Kombucha* fermentatsiooniprotsess on kombinatsioon alkoholkäärimisest, piimhappelisest käärimisest ja äädikhappekäärimisest (Villerreal-Soto jt. 2018, Tran jt. 2020a). Teeseene kasvuga seoses toimuvad erinevad fermentatsiooniprotsessid sellepärast, et teeseene kasvukeskkonnas esineb mitmeid erinevaid pärmseeni ja baktereid. Fermentatsiooni algatavad osmotolerantsed mikroorganismid, aga protsessi lõpus on domineerivaks happelist keskkonda taluvad liigid (Villerreal-Soto jt. 2018). Fermentatsiooniprotsessi põhiproduktidena tekivad bakterite ja pärmseente elutegevuse tulemusena teeseen ja fermenteeritud tee (*kombucha*) (Jayabalan jt. 2010, Villerreal-Soto jt. 2018).

Fermentatsiooniprotsessi alguses hüdroolüüsivad pärmseened suhkruga rikastatud musta tee lahuses oleva sahharoosi glükoosiks ja fruktoosiks (Teuber 1995, Aidoo jt. 2006, Villerreal-Soto jt. 2018). Pärmseened fermenteerivad tekkinud glükoosi ja fruktoosi etanooliks, glütserooliks ja CO<sub>2</sub>-ks (Teoh jt. 2004, Sathishkumar jt. 2009, El-Salam 2012, Villerreal-Soto jt. 2018). Etanool oksüdeeritakse äädikhappebakterite poolt atseetaldehüüdiks ja seejärel äädikhappeks (Teoh jt. 2004, El-Salam 2012, Kumar, Joshi 2016, Villerreal-Soto jt. 2018). Protsess viiakse läbi alkoholdehüdrogenaasi ja aldehüüddehüdrogenaasi abil, mille tulemusena saadakse vesi ja CO<sub>2</sub> (Teysser, Hamdouche 2016 ref Leal jt. 2018). Ühe mooli etanooli täielikuks oksüdeerimiseks on vaja ühte mooli hapnikku, mistõttu on oluline hapniku ülekandumine õhust kasvulahusesse (Villerreal-Soto jt. 2018). Piimhape sünteesitakse piimhappebakterite poolt glükoosist ja sahharoosist (Dutta, Paul 2019). Kui piimhappebakterid puuduvad, siis moodustatakse piimhape äädikhappebakterite poolt etanoolist ja äädikhapest (Reiss 1994 ref Cvetković jt. 2019).

Teeseene süsteemi kõige olulisem mikroob *K. xylinus* oksüdeerib metabolismi käigus kasvulahuses oleva etanooli äädikhappeks ja glükoosi glükoonhappeks (Teuber 1995, Kongruang 2008, Villerreal-Soto jt. 2018). Teise spetsiifilise metabolismi käigus sünteesib *K. xylinus* bakteriaalset tselluloosi, mille kõrvalsaadus on äädikhape (Kongruang 2008, Villerreal-Soto jt. 2018). *K. xylinus* moodustab tselluloosi õhukese kilena kasvulahuse ja õhu piirpinnale, sest ta vajab oma elutegevuseks hapnikku (Jayabalan jt. 2010, Rühs jt. 2018). Suurem osa *K. xylinus*'e rakkudest paikneb moodustuva tselluloosi kile pinnal, kus toimub ka uue tselluloosi sünteesimine (Kongruang 2008). Uus tselluloos moodustub

varem toodetud tselluloosi peale kihtidena ning selle tulemusel toimub tselluloosikihi paksenemine (Teuber 1995). *K. xylinus* kasvab soodsates kontrollitud tingimustes kiiresti ning ta võib toota tselluloosi mitmetest süsinikuallikatest, sealhulgas glükoosist, etanoolist, sahharoosist ja glütseroolist (Villerreal-Soto jt. 2018).

Pärmid on *kombucha* fermentatsiooniprotsessis olulised sellepärast, et pärmirakkude surma ja autolüüsi käigus moodustuvad vitamiinid ja teised toitained, mis stimuleerivad bakterite kasvu (Villerreal-Soto jt. 2018). Lisaks moodustuvad pärmide ja bakterite elutegevuse tulemusena kasvulahusesse mitmed maitsekomponendid (Zhao jt. 2018). Seda omadust on võimalik kasutada *kombucha* fermenteerimisel erinevate pärmikultuuridega, et anda joogile soovitud maitseomadused (Abel, Andreson 2020; lisa 1).

#### **1.2.4. Mikroobide vastastikune mõju teeseene süsteemis**

Teeseen ja *kombucha* moodustavad süsteemi, milles esinevate mikroobide omavahelised suhted on väga keerulised ning kus mikroobide vahel võivad esineda nii konkurents kui ka omavaheline kasulik koostöö (May jt. 2019). Fermentatsiooni käigus toodavad pärmid invertaasi ja eemaldavad jääkaineid alkoholi metabolismi teel ning bakterid viivad läbi tselluloosi sünteesi (Rühs jt. 2018, Villerreal-Soto jt. 2018, May jt. 2019). Võõrmikroobide kasvu takistavad lahuses esinevad antimikroobsed metaboliidid, kasvulahuse madal pH ning füüsiline barjäär (tselluloos/teeseen) kasvulahuse ja väliskeskkonna vahel (Teoh jt. 2004, May jt. 2019).

*Kombucha* fermentatsiooniprotsessi alguses lõhustatakse sahharoos pärmseente poolt sünteesitud invertaasi abil glükoosiks ja fruktoosiks (Chen, Liu 2001, Dutta, Paul 2019). Sahharoosi lõhustamise protsessi ajal toimub mikroobide vahel kasulik koostöö. Näiteks Tran jt. (2020a) uurimuses leiti, et äädikhappebakterite olemasolu kasvulahuses suurendas *Saccharomyces cerevisiae* invertaasi tootmise võimet. Lisaks leidub teeseene süsteemis pärme ja äädikhappebaktereid, kes ei ole võimelised sahharoosi hüdrolyüsi ise läbi viima, olles seetõttu sõltuvad kõrge invertaasi-aktiivsusega pärmidest (nt. *Brettanomyces bruxellensis*), kes sünteesivad monosahhariide (Tran jt. 2020a). Samas võib tekkida mikroobide vahel konkurents, sest sahharoosi hüdrolyüsi käigus vabanenud monomeerid

on süsinikuallikana kättesaadavad kõigile süsteemis esinevatele bakteritele ja pärmseentele (May jt. 2019).

Pärmid fermenteerivad suhkrud etanooliks ning bakterid oksüdeerivad etanooli, et toota äädikhapet (Teoh jt. 2004, Sathishkumar jt. 2009, El-Salam 2012). Etanool ja äädikhape kaitsevad süsteemi keskkonnast pärinevate mikroobide sissetungi eest, inhibeerides võõrmikroobide kasvu (May jt. 2019). Siinkohal tekib küsimus, kui suures ulatuses on nimetatud ühendid võimelised võõrmikroobe inhibeerima. Näiteks Chakravorty jt. (2016) leidsid teeseene süsteemist mikroobe, keda tavaliselt teeseenes ega *kombucha*'s ei leidu. Uurimuses oletati, et mikroobid sattusid teeseene süsteemi keskkonnast (veest).

Teeseene süsteemis esinevatele mikroobidele võib avaldada fermentatsiooniprotsessi saadusena moodustuv etanool nii positiivset kui ka negatiivset mõju. Näiteks teeseenes esinevad bakterid kasutavad etanooli energiaallika ja toitainena, aga etanool võib ka kahjustada mikroobide rakumembraani ja vähendada mikroobide elujõulisust (May jt. 2019). Etanooli kontsentratsiooni vähenemisele aitavad kaasa äädikhappebakterid, kes oksüdeerivad etanooli äädikhappeks ning langetavad seeläbi *kombucha* pH väärtust (Teoh jt. 2004, Kumar, Joshi 2016, May jt. 2019).

Bakterite poolt fermentatsiooniprotsessi käigus sünteesitud tselluloos (teeseen) pakub kaitset võõrmikroobiota eest (ümbristevast keskkonnast pärinevad mikroobid), kaitseb UV-kiirguse kahjulike mõjude eest, aitab hoida ressursse, hõlbustab mikroobide ligipääsu toitainetele ning võimaldab tselluloosiga seotud mikroobidele paremat juurdepääsu hapnikule (Yassunaka jt. 2018, May jt. 2019). Tselluloosi moodustumisel aga tekib kasvulahusesse (teeseene alla) anaeroobne keskkond ning selle tõttu ei saa kasvulahuses kasvada mikroobid, kes vajavad oma elutegevuseks hapnikku (May jt. 2019).

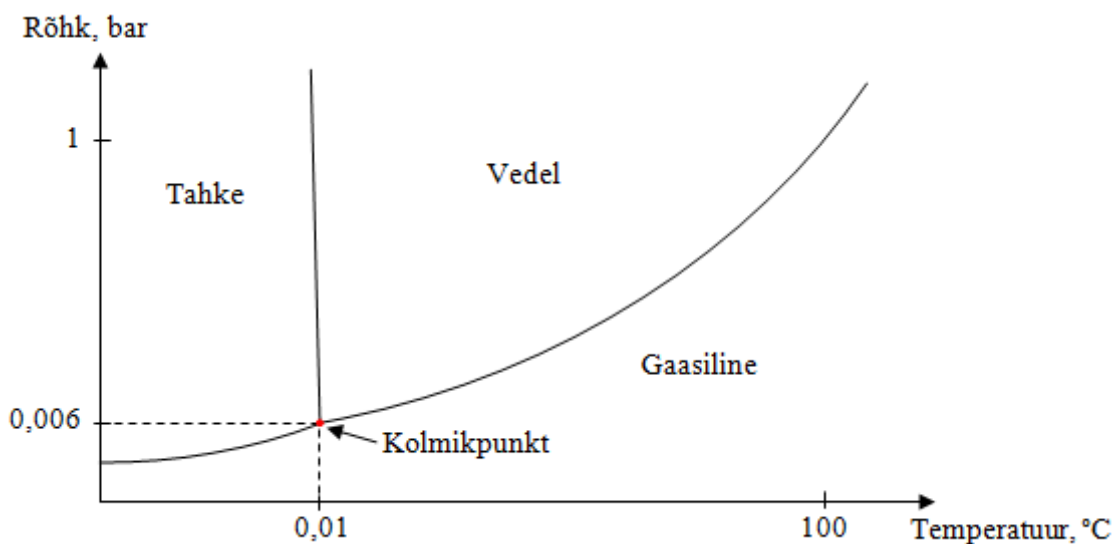
Piimhappebakterite ja äädikhappebakterite vahel võib *kombucha* fermentatsiooniprotsessi ajal samuti koostöö toimuda. Seto jt. (2006) kasvasid tselluloosi sünteesivat äädikhappebakterit *Gluconacetobacter xylinus* (uuema nimega *K. xylinus*) koos piimhappebakteriga *Lactobacillus mali* ja leidsid, et *L. mali* soodustab tselluloosi sünteesi *K.xylinus*'e poolt. Yang jt. (2010) kasvasid *Gluconacetobacter* sp. A4 tüve koos kümne erineva piimhappebakteriga ning katse tulemuste põhjal jõudsid järeldusele, et piimhappebakterite poolt sünteesitud metaboliidid (ksüliitool, äädikhape) soodustasid äädikhappebakterite kasvu.



### 1.3. Lüofiliseerimisprotsess

Lüofiliseerimine ehk külmutamine on protsess, mille käigus vesi eemaldatakse külmutatud materjalist jääkristallide sublimatsiooni teel (vesi läheb tahkest olekust gaasilisse, jättes vahele vedela oleku) (Gaidhani jt. 2015, Gangurde jt. 2019). Pärast sublimeerumist toimub sekundaarne kuivatamine, mille käigus jääniiskus eemaldatakse või selle hulk viiakse võimalikult madalale tasemele (Conde-Islas jt. 2019).

Proovid külmutatakse enne lüofiliseerimist sügavkülmikus või lüofilisaatoris (Morgan jt. 2006). Pärast külmutamist viiakse lüofilisaatoris läbi kuivatamistsüklid, mis koosneb kahest põhiosast – primaarsest ja sekundaarsest kuivatamisest (Morgan jt. 2006, Gaidhani jt. 2015). Atmosfäärirõhul (1 bar) võib veel olla kolm faasi – tahke, vedel ja gaasiline, aga kolmipunktist (0,01 °C, 0,006 bar) madalamal on veel ainult kaks faasi – tahke ja gaasiline (Gaidhani jt. 2015) (joonis 2). Vee sublimeerumine saab toimuda siis, kui rõhk ja temperatuur on kolmipunktist madalamad (Gangurde jt. 2019), mistõttu on vaja primaarse kuivatamise läbiviimiseks/vee sublimeerimiseks langetada vaakumpumba abil lüofilisaatoris rõhku (Morgan jt. 2006, Gaidhani jt. 2015).



**Joonis 2.** Vee olekudiagramm (koostatud allikate Gaidhani jt. 2015 ja Ponsa jt. 2017 põhjal).

Sublimatsiooni käigus tekkinud veeaur eemaldatakse lüofilisaatori vaakumkambrist kondensaatori abil ning see viiakse tahkesse olekusse (veeaur ladestub kondensaatori

pinnal jääna) (Gaidhani jt. 2015, Kumar 2019). Primaarse kuivatamise käigus on proovi kokkuvajumine ja sulamine endiselt võimalikud, sest tootesse jääb veel külmunud vett (Morgan jt. 2006, Gangurde jt. 2019). Selle tõttu viiakse primaarne kuivatamine läbi madalatel temperatuuridel ja pika aja jooksul (Morgan jt. 2006).

Sekundaarne kuivatamine algab siis, kui kogu külmunud vesi on sublimeerunud ning kui proovi on alles jäänud ainult seotud vesi, mis eemaldatakse difusiooni ja resorptsiooni teel (Morgan jt. 2006, Conde-Islas jt. 2019, Kawasaki jt. 2019). Protsessi käigus kasutatakse kõrgemat temperatuuri ja madalamat rõhku kui primaarse kuivatamise ajal (Gaidhani jt. 2015, Kawasaki jt. 2019). Sekundaarse kuivamise lõpp-punkt määratakse tavaliselt lüofiliseeritud toote jääkniiskuse analüüsiga pärast seda, kui toode on kambrist eemaldatud (Morgan jt. 2006).

### **1.3.1. Mikroobide lüofiliseerimine**

Mikrobioloogias kasutatakse lüofiliseerimist laialdaselt mikroobide uurimiseks, mikroobikollektsioonide säilitamiseks ning vaktsiinide ja antibiootikumide tootmisel kasutatavate aktiivsete tüvede säilitamiseks (Kupletskaya, Netrusov 2011). Antud meetodit eelistatakse pikaajaliseks kultuuride säilitamiseks sellepärast, et lüofiliseeritud kultuuride hoolduskulud on madalad, nende transportimine on lihtne (Prakash jt. 2013) ning eduka lüofiliseerimise tulemusel säilitavad mikroobid elujõulisuse paljudeks aastateks (Portner jt. 2007). Lüofiliseerimine sobib hästi mitmete bakterite, pärmide ja sporuleeruvate seente säilitamiseks, aga meetod ei ole piisavalt hea mitte-sporuleeruvate seente (vegetatiivsed hüüfid) ning ka teatud pärmseente ja bakterite säilitamiseks (Berni, Hennebert 1991, Smith jt. 2008, Prakash jt. 2013). Mikroobide lüofiliseerimise meetodikad varieeruvad tulenevalt nii erinevatest mikroobiliikidest kui ka sama liigi erinevatest tüvedest (Morgan jt. 2006).

Enne lüofiliseerimise läbiviimist kasvatatakse mikroobe sobivas vedelsöötmes. Mikroobide rakud kogutakse tsentrifuugimise teel kokku (1079-12000 g, 10 min, 4 °C), rakud pestakse, tsentrifuugitakse ning rakkudest valmistatakse suspensioon (Palmfeldt, Hahn-Hägerdal 2000, Carvalho jt. 2002, Ndoye jt. 2007, Maneesri jt. 2011, Chanyuan jt. 2012, Chotiko, Sathivel 2014, Wang jt. 2015). Suspensiooni valmistamiseks võib kasutada näiteks piima- või lõssipulbrist valmistatud lahust, lõssi, steriilset destilleeritud vett ja NaCl lahust

(Palmfeldt, Hahn-Hägerdal 2000, Carvalho jt. 2002, Nyanga jt. 2012, Chotiko, Sathivel 2014, Sharma jt. 2014, N'Guessan jt. 2016, Yongxiang jt. 2017). Saadud suspensiooni sisse võib lisada erinevaid krüoprotektoreid (nt. sahharoos, glütserool, glükoos, lõss, maltoos, trehhaloos, naatriumtsitraat, mannitool, laktoos), mis kaitsevad mikroobe krüovigastuste (külmutamise tagajärjel tekkivate vigastuste) eest (Prakash jt. 2013, N'Guessan jt. 2016, Yongxiang jt. 2017).

Proovid külmutatakse sügavkülmikus või lüofilisaatoris (Morgan jt. 2006, N' Guessan jt. 2016). Lüofilisaatoris toimub külmutamine aeglaselt, moodustuvad suured jääkristallid ning selle tagajärjel tekivad proovi pinnale suured poorid, mis hõlbustavad auru eemaldumist ja aitavad kaasa parema välimusega valmistoote saamisele (Morgan jt. 2006, Gaidhani jt. 2015). Mikroobide külmutamisel on elujõulisuse säilitamine olulisem kui valmistoote välimus ning seetõttu soovitatakse külmutamine läbi viia kiiresti, sest aeglasel külmutamisel tekkivad suured jääkristallid võivad kahjustada rakumembraani (Morgan jt. 2006). Samas, Seki jt. (2008) tõid oma uurimuses välja, et külmutamist ei tohi läbi viia väga kiiresti, kuna sellisel juhul moodustub rakusisene jää, mis on mikroobide jaoks surmav. Autorid leidsid, et temperatuuri ei tohiks langetada kiiremini kui 20 °C minutis.

Erinevates teadustöodes on kasutatud mikroobide lüofiliseerimiseelse külmutamise läbiviimiseks erinevaid režiime (tabel 3).

**Tabel 3.** Mikroobide lüofiliseerimiseelse külmutamise režiimid

Temperatuur (°C)	Aeg (h)	Kirjanduse allikad
-80	24	Ndoye jt. 2007
-60	24	Maneesri jt. 2011
-20	3	Chanyuan jt. 2012
-58	3	Nyanga jt. 2012
-20	24	Chotiko, Sathivel 2014
-80	1	Wang jt. 2015
-40	24	N ' Guessan jt. 2016
-80	6	Yongxiang jt. 2017

Külmutatud proovid lüofiliseeritakse lüofilisaatoris. Lüofiliseerimisel on oluline jälgida kolme parameetrit, milleks on temperatuur, aeg ja rõhk (tabel 4).

**Tabel 4.** Mikroobide lüofiliseerimiseks kasutatud režiimid

Temperatuur (°C)	Aeg (h)	Rõhk (mbar)	Kirjanduse allikad
-50	48	0,067-0,13	Chanyuan jt. 2012
-50	-	0,04	Sharma jt. 2014
-45	24	0,3	Wang jt. 2015
-60	32	-	N' Guessan jt. 2016
-36	18	0,2	Yongxiang jt. 2017
-42	2	0,1	Yongxiang jt. 2017

Lüofiliseerimisel on soovitatav kasutada kõrget mikroobirakkude esialgset kontsentratsiooni ( $> 1 \times 10^8$  rakku/ml), sest suur osa mikroobide rakkudest sureb pikaajalisel säilitamisel (Morgan jt. 2006).

Lüofiliseeritud proove on vaja säilitamisel kaitsta hapniku, niiskuse, valguse, mikrobioloogilise saastumise ja kõrgete temperatuuride eest (Morgan jt. 2006, Ndoeye jt. 2007, Smith jt. 2008, Gangurde jt. 2019). Nimetatud nõuete täitmiseks peab lüofiliseeritud proovide pakendamiseks kasutatav materjal olema niiskust ja õhku mitte läbilaskev (Gangurde jt. 2019). Tavaliselt säilitatakse lüofiliseeritud proove ampullides või klaasviaalides, aga kasutada võib ka kõrge barjääriga plastpakendeid, blisterpakendeid ja alumiiniumkotte (Morgan jt. 2006, N'Guessan jt. 2016). Proovide jahutatult säilitamine (temperatuuril 4-8 °C) vähendab mikroobide kahjustumise määra ja pikendab säilivusaega (Smith jt. 2008, Gangurde jt. 2019).

Lüofiliseeritud materjali rehüdreerimiseks on võimalik kasutada mitmeid erinevaid lahuseid, näiteks peptoonlahust, deioniseeritud vett või lõssi (Chen jt. 2006, Ndoeye jt. 2007, Maneesri jt. 2011, Wessman jt. 2013, Wang jt. 2015). Ndoeye jt. (2007) rehüdreerisid lüofiliseeritud mikroobidest koosneva pulbri (1 g) peptoonlahuses, segades suspensiooni Vortex'il 10 min. Pärast seda tehti sobivatest kümnendlahjendustest söötmetele külvid, et määrata mikroobide elujõulisus pärast lüofiliseerimisjärgset säilitamist. Chen jt. (2006) leidsid, et rehüdreerimisel kasutatud lahus (lõss ja deioniseeritud vesi) ei mõjutanud mikroobide elujõulisust, kuigi varasemates uurimustes oli saadud vastupidiseid tulemusi. Lisaks leidsid Chen jt. (2006), et 4 °C juures rehüdreerimisel oli pärmide elujõulisus suurem, aga autorid tõid välja, et varasemates teadustöodes on leitud, et rehüdreerimine külmkapitemperatuuril võib põhjustada rakusiseste ainete lekkimist rakkudest, mille tagajärjel mikroobide elujõulisus langeb.

### **1.3.2. Suspensiooni keskkond**

Suspensiooni keskkonda kasutatakse jahutamise- ja kuivatamisprotsesside käigus tekkivate rakuvigastuste vältimiseks (Smith jt. 2008). Suspensiooni keskkond koosneb lüofiliseeritava mikroobi rakkudest ja mikroobi rakke madalate temperatuuride eest kaitsvatest ühenditest (nt. glütserool, sorbitool, metanool, želatiin, sahharoos, lõss, glükoos) (Kupletskaya, Netrusov 2011, Prakash jt. 2013, Criste jt. 2014). Ideaalne lüofiliseerimiseks kasutatav suspensiooni keskkond peaks sisaldama krüoprotektoreid ja maatriksmaterjale või abiaineid (Prakash jt. 2013). Suspensiooni keskkonna komponentidel on lüofiliseerimise käigus kaks peamist funktsiooni: saada lõpptooteks kindla füüsilise struktuuriga kuiv materjal, mis toimib tugimaterjalina ja rehüdratsiooni retseptorina ning kaitsta elusaid rakke biokeemiliselt külmumise ja/või kuivamise ajal tekkivate kahjustuste eest (Berni, Hennebert 1991). Suspensiooni keskkonnas kasutatavad ained peaksid olema lihtsasti kättesaadavad, hõlpsasti valmistatavad ning tagama piisavas ulatuses rakkude kaitse lüofiliseerimise ajal (Smith jt. 2008).

Suspensiooni keskkonnas kasutatavatel ühenditel on erinev toimemehhanism. Berni ja Hennebert (1991) tõid oma uurimuses välja, et lõss ja dekstraan annavad külmuivatatud materjalile kerge ja poorse struktuuri, mis muudab rehüdratsiooni lihtsaks. Seevastu polüvinüülpürrolidoon, karboksümetüülselluloos ja hüdroksümetüülselluloos kuivatatud suspendeeriva keskkonnana on kerged ja poorsed, kuid raskesti rehüdreeritavad. Lisaks olid autorid välja toonud, et skisofüllaan ja algiinhape muutuvad kuivatamisel sitkeks ja üsna lahustumatuks ning inositol, naatriumglutamaat, dekstroos, sahharoos, trehhaloos, rafinoos ja mesi ei kuiva, kui neid kasutatakse kontsentratsioonil  $> 10\%$ .

#### **1.3.2.1. Krüoprotektorid**

Külmsäilitamisel kasutatakse krüoprotektoreid, mis kaitsevad lüofiliseerimise ajal rakke krüovigastuste eest (Prakash jt. 2013, Bhattacharya 2018). Krüoprotektorid aitavad vältida jääkristallide moodustumist, tundlike valkude denatureerumist ning muutusi rakumembraani töös (Chanyuan jt. 2012). Ideaalne krüoprotektor peab olema mittereageeriv, vees hästi lahustuv, tungima raku sisse, olema madala toksilisusega ega tohi sadeneda, kui seda kasutatakse suurtes kontsentratsioonides (Prakash jt. 2013).

Kasutatava krüoprotektori tüüp sõltub suuresti lüofiliseeritavatest mikroorganismidest ning oluline on arvestada iga krüoprotektori toksilisust konkreetsete mikroobide suhtes eraldi (Hubalek 2003, Criste jt. 2014).

Krüoprotektoritena on võimalik kasutada mitmeid erinevaid keemilisi ühendeid, aga krüoprotektoreid, mida laialdasemalt kasutatakse ja mis annaks ka rahuldavaid tulemusi, on vähe (Criste jt. 2014). Efektiivseimad krüoprotektorid on näiteks dimetüülsulfoksiid (DMSO), glütserool, propüleenglükool, etüleenglükool, sorbitool, metanool ja seerum või seerumalbumiin (Hubalek 2003, Criste jt. 2014). Antud ühenditest peetakse kõige universaalsemaks DMSOd (Hubalek 2003).

Krüoprotektorite toime on küllaltki erinev. Näiteks suhkrud tungivad mikroobide rakkudesse, suurendavad osmootset rõhku ning takistavad seeläbi jääkristallide moodustumist ja rakkude hävinemist, samas kui valgulised ühendid ei tungi rakkudesse, vaid soodustavad rakuseina tihedat külgnemist tsütoplasma (see on oluline raku sulatamise ajal) (Kupletskaya, Netrusov 2011). Glütserool on võimeline tungima läbi erinevate rakutüüpide plasmamembraani (Fuller 2004), aga antud protsess kulgeb väga aeglaselt (Fuller 2004, Smith jt. 2008). Glütserooli toime seisneb selles, et ühend moodustab veemolekulidega vesiniksidemeid, raskendades seeläbi jääkristallide moodustumist (Bhattacharya jt. 2018).

Krüoprotektorid klassifitseeritakse peamiselt rakku läbistavateks ja rakku mitte läbistavateks (Prakash jt. 2013). Soovitav on läbistavaid ja mitte läbistavaid krüoprotektoreid omavahel kombineerida, sest sellisel juhul annavad need parema kaitsva efekti (Hubalek 2003). Rakku läbistavate krüoprotektorite peamine roll on rakkude dehüdratsiooni ja jää tekke vähendamine (Bhattacharya 2018). Laialdaselt kasutatavad rakumembraani läbistavad krüoprotektorid on etüleenglükool, propüleenglükool, DMSO, glütserool, formamiid, metanool ja butaandiool (Prakash jt. 2013, Best 2015). Glütserool ei tungi madalatel temperatuuridel eriti hästi raku sisse ning pakub seetõttu vähem kaitset (Prakash jt. 2013). DMSO rakku tungimise võime on parem kui glütseroolil (DMSO toime avaldumiseks kulub 15-30 minutit, samas kui glütserool vajab selleks enam kui 30 minutit), aga antud aine kasutamine on piiratud, sest DMSO avaldab suuremates kontsentratsioonides toksilist mõju (Heylen jt. 2012, Prakash jt. 2013). DMSO toksilisus sõltub ka temperatuurist, nt. temperatuuridel 0-5 °C on ühend vähem toksiline kui kõrgematel temperatuuridel (Hubalek 2003). Osa ühendeid (nt. mono- ja disahhariidid,

aminohapped ja madala molekulmassiga polümeerid) on võimelised läbistama ainult rakuseina, kuid mitte rakumembraani (Heylen jt. 2012).

Rakumembraani läbistavad krüoprotektorid on kõrgetel kontsentratsioonidel samuti toksilised (Best 2015). Kui krüoprotektor on potentsiaalselt toksiline või kasvu pidurdav, siis saab selle sulatamisjärgselt eemaldada tsentrifuugimise ja pesemise abil (Heylen jt. 2012). Rakku läbistavat krüoprotektorit võib pidada toksiliseks, kui see kahjustab rakumembraani, häirib ensüümide funktsiooni, halvendab mitokondrite funktsiooni, kahjustab DNA-d või valke (Best 2015).

Rakku mitte läbistavad krüoprotektorid on suure molekulmassiga polümeerid, mis kaitsevad mikroobe peamiselt rakuvälise jää moodustumise eest (Hubalek 2003, Heylen jt. 2012, Bhattacharya 2018). Rakku mitte läbistavad krüoprotektorid on näiteks polüvinüülpürrolidoon ja polüetüleenglükool, mis on väga toksilised võrreldes läbistavate krüoprotektoritega (kui neid kasutatakse samades kontsentratsioonides nagu läbistavaid krüoprotektoreid) (Bhattacharya 2018).

Krüoprotektoreid liigitatakse ka läbitungimise kiiruse järgi lisanditeks, mis sisenevad rakku kiiresti, umbes 30 minutiga ning lisanditeks, mis tungivad aeglaselt läbi raku (Criste jt. 2014). Kiiresti rakku läbistavad ühendid on näiteks metanool, etanool, etüleenglükool, propüleenglükool ja DMSO (Heylen jt. 2012, Criste jt. 2014). Aeglaselt rakku läbistavad lisandid on glütserool, mono-, oligo- ja polüsahhariidid, mannitool, dekstraan, sorbitool, hüdroksüetüültärklis, albumiin, želatiin ja polüetüleen (Smith jt. 2008, Heylen jt. 2012, Criste jt. 2014).

### **1.3.3. Äädikhappebakterite lüofiliseerimine**

Äädikhappebakterite lüofiliseerimisega seonduvat on teadaolevalt vähe uuritud. Põhjuseks võib olla, et äädikhappebaktereid on keeruline isoleerida (eriti kääritatud jookidest) ja kasvatada kunstlikes söötmetes (Gomes jt. 2018). Äädikhappebakterite suurema lüofiliseerimisjärgse elujõulisuse saavutamiseks on oluline kasutada krüoprotektoreid (Ndoye jt. 2009), sest mikroobide arvukus väheneb lüofiliseerimisprotsessi käigus. Näiteks Maneesri jt. (2011) uurimistöös oli *Acetobacter aceti* TISTR102 tüve lüofiliseerimiseelne arvukus  $2,44 \times 10^{14}$  PMÜ/g, aga pärast lüofiliseerimist oli arvukus langenud väärtusele

$2,73 \times 10^9$  PMÜ/g. Ndoye jt. (2009) leidsid, et ilma krüoprotektorita lüofiliseeritud mikroobirakkude stabiilsus langes järsult 6 kuu pikkuse säilitamisperioodi jooksul ning lõplik mikroobide elulemus oli 10%, aga krüoprotektoriga (mannitooliga) säilitamisel oli elulemus märgatavalt kõrgem – 50%. Äädikhappebakterite lüofiliseerimisel on kasutatud krüoprotektoritena näiteks mannitooli, glütserooli, linnaseekstrakti, sahharoosi, maltoosi,  $\text{CaCO}_3$  ja sorbitooli (Ndoye jt. 2007, Ndoye jt. 2009, Maneesri jt. 2011).

*K. xylinus*'e säilitamiseks on kasutatud mitmesuguseid tehnikaid, näiteks külmutamist suspensioonis, kasutades krüoprotektoritena glütserooli, DMSO-d või lõssi (Chawla jt. 2009). Kuna *K. xylinus* toodab aeroobsetes tingimustes ekstratsellulaarset tselluloosi (Wiegand, Klemm 2006, Kongruang 2008, Villerreal-Soto jt. 2018), siis mikroobi säilitamiseks kasutatav meetod peab tagama kõrge elulemuse ega tohi mõjutada tselluloosi moodustumist (Wiegand, Klemm 2006). Wiegand ja Klemm (2006) leidsid, et glütserooli ja lõssi kasutamine krüoprotektoritena ei ole soovituslik, sest mõlemad ühendid muutsid *K. xylinus*'e poolt toodetud tselluloosi ja avaldasid mõju mikroobi metabolismile. DMSO sobis suspensiooni valmistamiseks kõige paremini, sest antud aine kasutamisel oli mikroobide elulemus kõrge ning ühend ei avaldanud märgatavat mõju moodustunud bakteriaalsele tselluloosile.

*K. xylinus*'e lüofiliseerimisel on kasutatud ka erinevate ainete kombinatsioone. Želatiini ja sahharoosi lahuses oli kohe pärast lüofiliseerimist *K. xylinus*'e elujõuliste rakkude hulk  $4,2 \times 10^5$  PMÜ/ampull, aga pärast 35 aastat säilitamist oli elujõulisi rakke  $1,9 \times 10^5$  PMÜ/ampull. Seevastu lõssi ja glükoosi lahuses oli antud mikroobi elujõulisi rakke kohe pärast lüofiliseerimist  $4,9 \times 10^5$  PMÜ/ampull, aga pärast 35 aastat säilitamist oli elujõuliste rakkude hulk vähenenud kuni  $3 \times 10^2$  PMÜ/ampull. (Kupletskaya, Arkad'eva 1997 ref Kupletskaya, Netrusov 2011; Bond 2007 ref Kupletskaya, Netrusov 2011) Antud tulemustest saab järeldada, et *K. xylinus*'e lüofiliseerimisel tuleks eelistada želatiini ja sahharoosi (kontsentratsioon vastavalt 1% ja 10%). Samas Wiegand ja Klemm (2006) leidsid, et želatiini kasutamisel oli mikroobide elulemus väga madal.



#### 1.3.4. Pärmseente lüofiliseerimine

Pärmseente säilitamiseks on samuti võimalik kasutada lüofiliseerimisprotsessi, aga antud meetodi kasutamise puudus on madal pärmide lüofiliseerimisjärgne elujõulisus (1-30%) (Smith jt. 2008). Näiteks Kupletskaya ja Netrusov (2011) uurimuses oli *Candida* perekonda kuuluvate pärmirakkude esialgne kontsentratsioon enne lüofiliseerimist  $10^9$ - $10^{10}$  rakku ampulli kohta, aga vahetult pärast lüofiliseerimist oli elujõuliste rakkude arv  $3-5 \times 10^5$  rakku/ampull. 50 aasta pikkuse säilitamise jooksul vähenes pärmirakkude arv järkjärgult ning 50 aasta möödudes oli elujõulisi rakke alles  $1,3 \times 10^3$  PMÜ/ampull. Pärmseente elulemus pärast lüofiliseerimist sõltub näiteks mikroobi tüvest (Smith jt. 2008), lüofiliseeritud mikroobide säilitamise temperatuurist, külmutamise temperatuurist ja kasutatavast suspensiooni keskkonnast.

Pärmid perekondadest *Lipomyces*, *Leucosporidium*, *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Bullera*, *Sporobolomyces* ja *Rhodospiridium* on väga madala elulemusega ning neid mikroobe ei saa standardmeetodi abil edukalt lüofiliseerida (Smith jt. 2008). Polo jt. (2017) jõudsid oma uurimistöös järeldusele, et uuritud mikroobidest olid lüofiliseerimise suhtes kõige vastupidavamad pärmid *Pichia membranifaciens*, *Starmerella bacillaris* ja *Metschnikowia pulcherrima*, kelle elujõulisus pärast lüofiliseerimist oli 16%. Seevastu pärmide *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, *Schizosaccharomyces pombe* ja *Issatchenkia occidentalis* elujõulisus oli kõige madalam (alla 5%). Teeseene süsteemis esineb mitmeid mikroobe, kes on lüofiliseerimise suhtes tundlikud (eespool nimetatud autorite tulemuste põhjal) – näiteks pärmseened perekondadest *Brettanomyces* ja *Dekkera* ning pärmseente liigid *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* ja *S. pombe*. Seetõttu on teeseenes leiduvate mikroobide lüofiliseerimise jaoks vaja valida sobilik suspensiooni keskkond ning sobilik lüofiliseerimise režiim.

Lüofiliseeritud pärmseente elujõulisust mõjutab näiteks mikroobide säilitamise temperatuur. Nii N'Guessan jt. (2016) kui ka Nyanga jt. (2012) tõid oma uurimistöös välja, et 4 °C juures säilis mikroobide elujõulisus paremini kui toatemperatuuril/ 25 °C juures. Polo jt. (2017) leidsid, et ka (lüofiliseerimiseelse) külmutamise temperatuuri ja pärmide elujõulisuse vahel on seos. Antud uurimuse tulemustest selgus, et -20 °C juures külmutamisel oli pärmseente elulemus suurem kui -80 °C ja -196 °C juures külmutamisel.

Elulemused oli erinevate temperatuuride kasutamisel keskmiselt 9,5% (-20 °C), 7,25% (-80 °C) ja 0,4% (-196 °C).

Pärmide lüofiliseerimisel on kasutatud mitmeid erinevaid suspensiooni keskkondi, näiteks sahharoosi, mett, lõssi, trehhaloosi ja galaktoosi (Berni, Hennebert 1991, Chen jt. 2006, N'Guessan jt. 2016). N'Guessan jt. (2016) leidsid, et pärmide lüofiliseerimisel toimis sahharoos kõige paremini krüoprotektorina ja hirsi jahu toetava materjalina. Parim krüoprotektori ja toetava materjali kombinatsioon oli sahharoos koos maniokijahuga (N'Guessan jt. 2016). Chen jt. (2006) uurimuses paranes 10% galaktoosi või 10% sahharoosi kasutamisel pärmide elujõulisus märkimisväärselt (rohkem kui 50% võrra), samas kui 10% trehhaloosi kasutamisel suurenes elujõulisus ainult 20% võrra. Berni ja Hennebert (1991) soovitasid kasutada pärmide lüofiliseerimisel suspensiooni keskkondi, mille koostisesse kuuluvad:

- 10% lõss koos 5% mee ja 5% naatriumglutamaadiga;
- 10% lõss koos 10% mee ja 5% naatriumglutamaadiga;
- 10% lõss koos 10% rafinoosi ja 5% naatriumglutamaadiga;
- 10% lõss koos 10% trehhaloosi ja 5% naatriumglutamaadiga.

Lisaks töid Berni ja Hennebert (1991) oma töös välja, et *S. cerevisiae* rakkude lüofiliseerimisel olid kõige efektiivsemad krüoprotektorid mesi ja trehhaloos, milles rakkude elujõulisus oli lüofiliseerimise järgselt vastavalt 60% ja 74%. Lõssis oli antud pärmseene elujõulisus 30% ning dekstraanis 24%.

### **1.3.5. Bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimine**

Bakteriaalne tselluloos on väga mitmekülgsest kasutatav biomaterjal, mida on kasutatud näiteks paberitoodete, elektroonika ja biomeditsiiniseadmetega seotud teadusuuringutes (Keshk 2014). Teadustöodes on uuritud peamiselt lüofiliseerimise mõju bakteriaalse tselluloosi struktuuri omadustele (Clasen jt. 2006, Zhang jt. 2011, Pa'e jt. 2014, Zeng jt. 2014), aga lüofiliseerimise mõju bakteriaalses tselluloosis esinevatele mikroobidele on uuritud väga vähe (nt. Jagannath jt. 2010). Teadaolevalt ei ole viidud läbi teadustöid, mis annaksid ülevaate lüofiliseerimise mõjust teeseenes esinevatele mikroobidele.

Jagannath jt. (2010) uurisid *Acetobacter xylinum*'i (*K. xylinus*) poolt sünteesitud tselluloosi ning lisaks ka soolalahuse, lõssi, lüofiliseeritud bakteriaalse tselluloosi pulbri (puhas tselluloos, millest on mikroobid eemaldatud) ja alginaadi mikrokapslite toimet krüoprotektoritena piimhappebakterite lüofiliseerimisel. Bakteriaalse tselluloosi pulbri saamiseks lõigati bakteriaalne tselluloos väikesteks tükkideks, saadud tükid külmutati, lüofiliseeriti ning peenestati. Piimhappebakterite sidumiseks *A. xylinum*'i poolt sünteesitud tselluloosiga kasvatati piimhappebaktereid *de Man, Rogosa and Sharpe* vedelsöötmes, mis sisaldas steriilseid bakteriaalse tselluloosi tükke. Söödet inkubeeriti sobiva temperatuuri juures üleöö ning bakteriaalse tselluloosi tükid eemaldati söötmest, pesti ja lüofiliseeriti. Soolalahus ja lüofiliseeritud bakteriaalse tselluloosi pulber ei andnud uurimistöös soovitud tulemusi, aga ülejäänud materjalid (*K. xylinus*'e poolt sünteesitud tselluloos, lõss, alginaadi mikrokapslid) olid krüoprotektoritena kasutamiseks sobilikud. Lüofiliseerimiseelne piimhappebakterite arvukus oli 9-10 log PMÜ/ml, aga pärast 60 päeva pikkust säilitamisprotsessi oli bakteriaalses tselluloosis lüofiliseeritud mikroobide arvukus 4,3-5,7 log PMÜ/ml. Töös järeldati, et bakteriaalset tselluloosi on võimalik kasutada mikroobide lüofiliseerimisel krüoprotektorina. Sellest tulenevalt võib toimida ka teeseene koostisesse kuuluv bakteriaalne tselluloos teeseenes leiduvate mikroobide jaoks kaitsva ühendina.

Samalaadne uurimus viidi läbi ka Adebayo (2018) poolt, milles tehti kindlaks, et katsetöös kasutatud piimhappebakterid olid sidunud ennast bakteriaalse tselluloosiga, aga antud töös puudusid andmed bakteriaalse tselluloosi kaitsva toime efektiivsuse kohta lüofiliseerimisprotsessi käigus.

#### **1.4. Kirjanduse analüüsi kokkuvõte**

Teaduskirjanduse põhjal jõuti järeldusele, et *kombucha* tootmine toimub endiselt traditsiooniliselt, kasutades teeseent, ning teadaolevalt ei ole seni tegeletud *kombucha* starterkultuuri valmistamise meetodika väljatöötamisega.

Teeseene süsteemi kohta on teada, millised mikroobigrupid ja mikroobide liigid selles esinevad, milline on mikroobide roll fermentatsiooniprotsessis, kuidas kulgeb *kombucha* fermentatsiooniprotsess ning kuidas mikroobid teeseene süsteemis üksteist mõjutavad. Teeseene süsteemi kuuluvad peamiselt äädikhapebakterid ja pärmseened. Mõlema

mikroobigrupi lüofiliseerimisega seonduvat on vähe uuritud, enamasti on kasutatud mikroobide liike, keda teeseene süsteemis ei esine ning osa teemakohasest kättesaadavast informatsioonist ei ole ajakohane. Lisaks eelistatakse kummagi mikroobigrupi ja ka erinevate liikide lüofiliseerimisel erinevaid krüoprotektoreid.

Bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimise võimalusi on uuritud üksikutes varasemates teadustöodes, kus leiti, et tselluloosiga seotud mikroobid säilitasid lüofiliseerimisjärgselt oma elujõulisuse. Teeseene lüofiliseerimisega seonduvat ei ole aga teadaolevalt varem uuritud.

Kirjanduse analüüsimise käigus kogutud informatsioon ei ole piisav tööstusliku, konkreetsetest mikroobidest koosneva ega ka lüofiliseeritud teeseenest valmistatud starterkultuuri väljatöötamiseks. Selleks, et töötada välja starterkultuur, on vaja teada, milliste konkreetsete mikroobiliikide olemasolu on *kombucha* tootmisel olulise tähtsusega – näiteks, millised liigid algatavad fermentatsiooniprotsessi ja millised liigid on olulised *kombucha* joogi sensorsete omaduste kujundamisel. Praeguseks on endiselt teada ainult *K. xylinus*'e, kui teeseene süsteemi kõige olulisema mikroobi roll *kombucha* fermentatsiooniprotsessis, aga teiste mikroobide tähtsust nagu ka teeseene süsteemi mikroobide omavahelist sobivust ei ole liigipõhiselt hinnatud. Lisaks on oluline selgitada välja, millised on optimaalsed parameetrid nii teeseene süsteemi kuuluvate mikroobide kui ka teeseene lüofiliseerimiseks.

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Eesmärk ja ülesanded**

Magistritöö eesmärk on anda ülevaade teeseene süsteemist, selles esinevatest mikroobidest ja nendevahelistest suhetest, mikroobide ja bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimisest ning selgitada, kas ja kuidas mõjutab teeseene lüofiliseerimine selle kasutamist *kombucha* starterkultuurina.

Magistritöö ülesanded:

- 1) hinnata erinevate krüoprotektorite mõju lüofiliseeritud teeseenes esinevatele mikroobidele;
- 2) määrata mikroobide üldarv, kirjeldada nende morfoloogiat, identifitseerida isoleeritud mikroobid ja hinnata lüofiliseeritud teeseeneproovide abil kääritatud teelahuste omadusi, et teha kindlaks, kas lüofiliseeritud teeseent saab kasutada *kombucha* starterkultuurina.

### **2.2. Materjal ja metoodika**

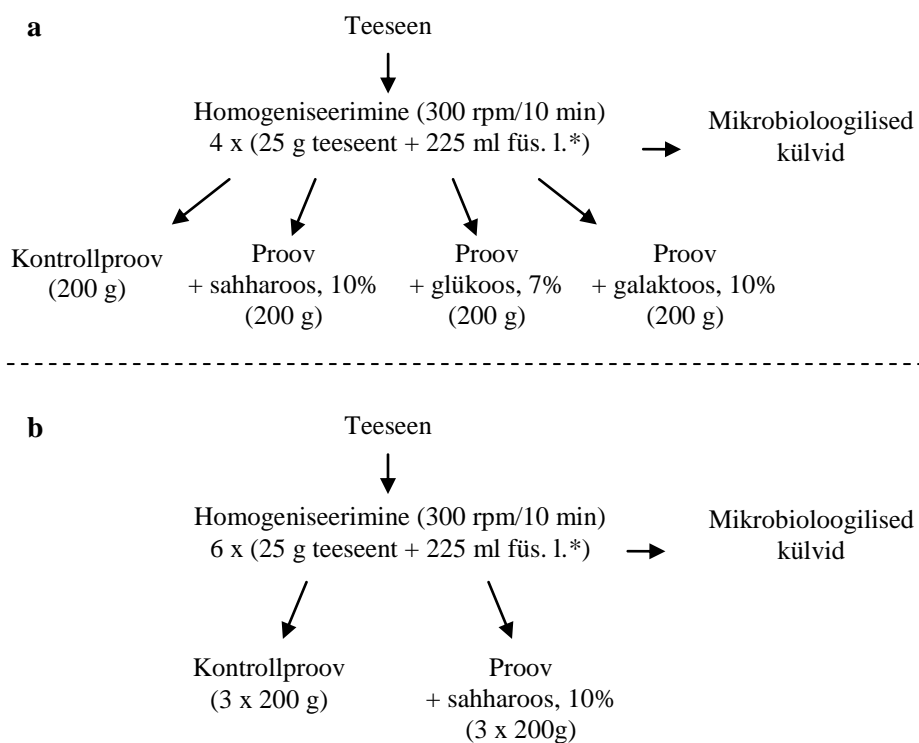
#### **2.2.1. Uuritav materjal**

Magistritöö katsete raames kasutati 13 päeva vanuseid musta tee ja sahharoosi lahuses kasvanud teeseeni. Iga katseseeria (KS) käigus kasutati ühte teeseent, millest lõigati välja neli (KS I-V) või kuus (KS VI-IX) ühesuguse suurusega tükki (mass 25 g).

#### **2.2.2. Proovide lüofiliseerimiseelne ettevalmistamine**

Teeseenest välja lõigatud 25 g suurused tükid homogeniseeriti homogenisaatoris (*Stomacher®400 Circulator, Seward Ltd.*, Inglismaa) koos 225 ml füsioloogilise lahusega

300 rpm/10 min (joonis 3). Peenestatud teeseened valati esimese viie katseseeria (KS I-V) käigus koos füsioloogilise lahusega nelja plastkarbi sisse ning viimase nelja katseseeria (KS VI-IX) ajal kuue karbi sisse. Proovi kogus ühes karbis oli 200 g. Ülejäänud osa peenestatud teeseenemassidest kasutati mikrobioloogiliste külvide läbiviimiseks.



**Joonis 3.** Üheksa katseseeria (KS) proovide lüofiliseerimiseelne ettevalmistus (a – KS I-V; b – KS VI-IX; \*füs. l. – füsioloogiline lahus).

Peenestatud teeseene ja füsioloogilise lahuse segudele lisati krüoprotektorid. Esimese viie katseseeria käigus kasutati krüoprotektoritena erinevaid suhkruid (joonis 3a).

Esimeste katseseeriade (KS I-V) käigus selgus, et lüofiliseeritud proovi kogus on *kombucha* joogi tootmiseks liiga väike. Selleks, et oleks võimalik proovi kogust suurendada, valiti viie katseseeria põhjal välja kõige sobivam krüoprotektor – sahharoos, millega viidi läbi järgmised neli katseseeriat (joonis 3b).

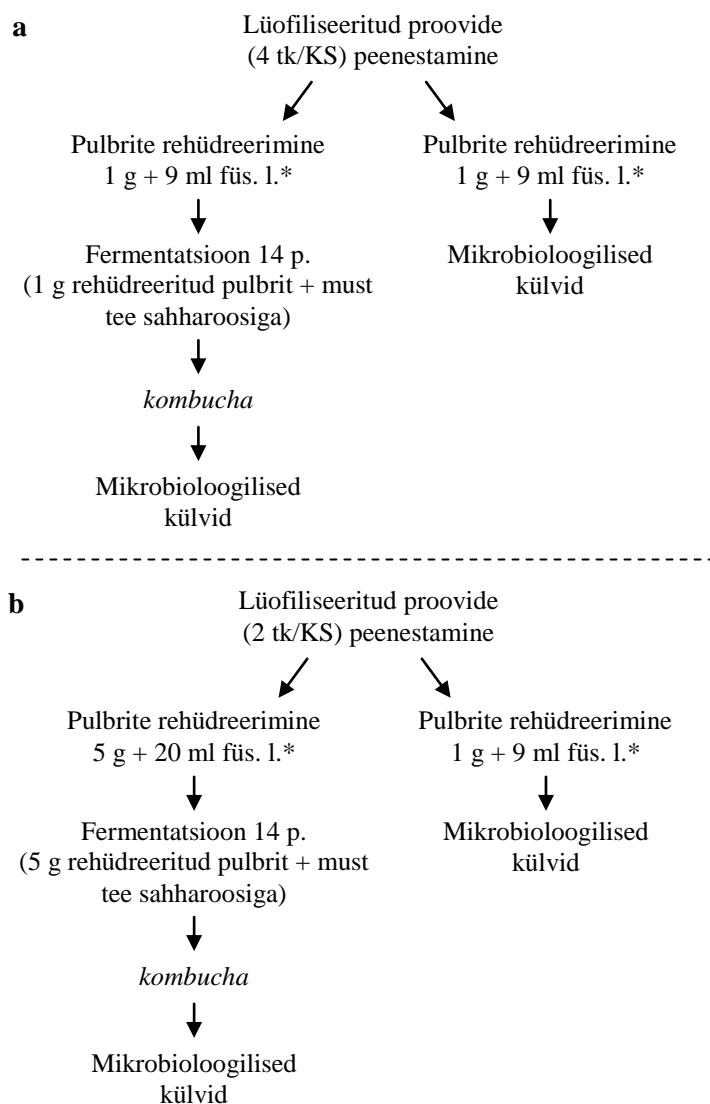
Kõik proovid külmutati 24 h temperatuuril -20 °C ning lüofiliseeriti seejärel lüofilisaatoris (FT33 – Vacuum Freeze Dryer, Armfield Ltd., Inglismaa) 72 h (tingimustel -53 °C; 0,155-0,161 mbar).

### **2.2.3. Musta tee lahuse valmistamine**

Teelahuse valmistamiseks kasutati 4 g/l musta teed (Dilmah Premium, *MJF Holdings Ltd*, Sri Lanka), mida hoiti kuumas keedetud vees 2 minutit. Seejärel lahustati mustas tees 100 g/l sahharoosi (Suhkur Diamant, *Pfeifer & Langen Polska S.A.*, Poola). Saadud lahus jaotati 720 ml (KS I-V) või 580 ml (KS VI-IX) mahutavusega purkidesse (igasse 500 ml – KS I-V või 300 ml – KS VI-IX) ja jäeti toatemperatuurile suletult jahtuma.

### **2.2.4. Lüofiliseeritud proovidest kombucha joogi valmistamine**

Lüofiliseeritud proovid peenestati spaatli abil ning teeseene kasvatamiseks ja kombucha valmistamiseks kaaluti 1 g (KS I-V) või 5 g (KS VI-IX) pulbrit (joonis 4). Rehüdreerimise eesmärgil lisati pulbrile 9 ml (KS I-V) või 20 ml (KS VI-IX) füsioloogilist lahust. Saadud mass segati Vortex'il ja jäeti 30 minutiks toatemperatuurile seisma. Seejärel valati rehüdreeritud teeseenemass purki 500/300 ml musta tee lahuse sisse. Purk kaeti marliga ning marli kinnitati kummiga.



**Joonis 4.** Katseskeem lüofiliseeritud proovide abil kääritatud teelahuste valmistamise kohta üheksa katseseeria (KS) käigus (a – KS I-V; b – KS VI-IX; \*füs. l. – füsioloogiline lahus).

Fermentatsiooniprotsess viidi läbi pimedas suletud ruumis toatemperatuuril (20-22 °C) 14 ööpäeva jooksul. Kontrollproovina pandi viiendal fermentatsioonipäeval kasvama tavaline teeseen. Teeseene kasvatamisel arvestati, et fermentatsiooniprotsessi pikkus ei ületaks 10 päeva, sest vastasel korral on saadav *kombucha* tarvitamiseks liiga happeline. Pärast seda hinnati fermenteeritud lahuste kõlblikkust sensoorse analüüsi läbiviimiseks (visuaalsed märgid proovide käärimisest, saastatusest – hallitus).



### 2.2.5. Ettevalmistused mikrobioloogilisteks külvideks

Mikrobioloogilised külvid teostati nii algmaterjalist, lüofiliseeritud proovidest kui ka 14 ööpäeva käärinud musta tee lahustest. Algmaterjali analüüsimiseks kasutati proovide ettevalmistamisest üle jäänud homogeniseeritud teeseenemassi (joonis 3). Esimese viie katseseeria käigus segati mikrobioloogilisteks külvideks vajalik proov kokku neljast osaproovist (neli homogeniseeritud teeseene tükki) ja viimaste katseseeriade käigus kuuest osaproovist (kuus homogeniseeritud teeseene tükki). Osaproovidest saadud proov segati Vortex'il. Teeseene homogeniseerimisel koos füsioloogilise lahusega saadi proovi kümnekordne lahjendus ( $10^{-1}$ ), millest tehti kümnendlahjenduste rida. Selleks võeti  $10^{-1}$  lahjendusest automaatpipetiga 1 ml proovi, mis lisati 9 ml füsioloogilist lahust sisaldavasse katsutisse (saadi  $10^{-2}$  kümnendlahjendus).  $10^{-2}$  kümnendlahjendusega proovist võeti omakorda 1 ml lahust, mis pipeteeriti järgmisse 9 ml füsioloogilist lahust sisaldavasse katsutisse. Protseduuri jätkati, kuni saadi külvide tegemiseks sobilik kümnendlahjenduste rida.

Lüofiliseeritud proovid peenestati ning saadud pulber (igast proovist 1 g) rehüdreeriti 9 ml füsioloogilises lahuses 30 minutit, millest seejärel tehti kümnendlahjenduste rida eespool kirjeldatud viisil (joonis 4).

Kuna 14 päeva möödudes ei olnud lüofiliseeritud teeseenepulbritest teeseeni kasvanud, siis valmistati kümnendlahjendused ning teostati mikrobioloogilised külvid teeseenepulbrit sisaldanud teelahustest ( $10^0$ ) (joonis 4) ja kontrollproovist (10 päeva käärinud *kombucha*).

### 2.2.6. Mikrobioloogilised külvid

Kõigis proovides määrati bakterite, pärmseente ja äädikhappebakterite arvukus ning kirjeldati pärmseente ja (äädikhappe)bakterite morfoloogiat. Mikrobioloogiliste külvide tegemiseks kasutatud söötmed olid järgmised:

- MPCA- *Milk Plate Count Agar* (LAB 115), *LabM Ltd.*, Inglismaa, bakterite üldarvu määramiseks;
- SDA- *Sabouraud Dextrose Agar*, *Neogen*, Inglismaa, hallitus- ja pärmseente arvukuse määramiseks;

- GYCA- *Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Agar* (30 g glükoosi, 5 g pärmiekstrakti, 3 g peptooni, 10 g kaltsiumkarbonaati, 30 ml etanooli, 20 g agarit, 970 ml destilleeritud vett), äädikhappebakterite arvukuse määramiseks.

Bakterite, pärmseente ja äädikhappebakterite arvukuse määramiseks tehti paralleelkülvid, kus steriilsetele Petri tassidele pipeteeriti 1 ml proovi (valitud kümnendlahjendustest), millele valati vedel, 50 °C agarsööde. Proov segati söötmega ja jäeti toatemperatuurile tarduma. Mikroobide morfoloogia kirjeldamiseks tehti 10 µl külviaasaga pindkülvid SDA ja GYCA tahketele agarsöötmetele.

MPCA ja GYCA söötmetele tehtud külve inkubeeriti temperatuuril 30 °C ning SDA külvitasse temperatuuril 25 °C kolm kuni (vajadusel) seitse ööpäeva.

Mikrobioloogiliste külvide läbiviimiseks vajalikud vahendid (söötmed, füsioloogilised lahused) valmistati ette töö autori või laborispetsialisti Kersti Veske poolt.

### **2.2.7. Mikroobide üldarvu määramine ja morfoloogia kirjeldamine**

Mikroobide üldarvu määramiseks loendati MPCA, SDA ja GYCA söötmetele kasvanud mikroobide kolooniad. Seejärel kasutati üldarvu arvutamiseks valemit  $N = \frac{\sum a}{V * n * d}$ , kus

N – mikroobide üldarv milliliitris või grammis;

$\sum a$  – kolooniate summa kahel söötmetassil;

V – söötmetassile külvatud proovi kogus milliliitrites;

n – söötmetasside arv;

d – lahjendusfaktor.

Mikroobide üldarv väljendati ühikutes kümnendlogaritm pesasid moodustavat ühikut milliliitri või grammi kohta (log PMÜ/ml või log PMÜ/g). Tulemused loeti usaldusväärseks, kui söötmetassil oli 30-300 PMÜd.

Pärmseente ja äädikhappebakterite morfoloogia kirjeldamiseks võeti proovid pindkülvidega söötmetassidelt. Pärmseente kolooniatest tehti märgpreparaadid, aga äädikhappebakterite kolooniatest võetud proovid värviti enne mikroskopeerimist Grami

meetodil. Mikroskoobi abil kirjeldati pärmseente suurust, kuju ja pungumise iseloomu ning bakterite suurust, kuju, paiknemist ja värvumist (grampositiivne/gramnegatiivne).

#### **2.2.8. pH väärtuse määramine**

Kahe viimase katseseeria (KS VIII, KS IX) käigus määrati sahharoosi sisaldava musta tee, lüofiliseeritud teeseentega 14 päeva kääritatud teelahuste ning kontrollproovide (*kombucha*) pH väärtused. pH määramine kahes viimases katseseerias oli vajalik vastuoluliste tulemuste tekkepõhjuste väljaselgitamiseks. pH määramiseks kasutati pH-meetrit (*SevenCompact, Mettler Toledo*, Šveits).

#### **2.2.9. Mikroobide identifitseerimine MALDI-TOF meetodil**

Enne identifitseerimist kasvatati mikroobid sobivatel agarsöötmetel puhaskultuuridena (pärmseened SDA ja äädikhappebakterid GYCA söötmetel). Pärmseente ja äädikhappebakterite kolooniatest tehtud ümberkülve inkubeeriti 24 tundi vastavalt temperatuuridel 25 °C ja 30 °C.

MALDI-TOF analüüsid viidi läbi Tallinnas Terviseameti Nakkushaiguste Laboris ning Tartu Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis kummagi labori töötajate poolt.

#### **2.2.10. Pärmseente identifitseerimine API kit meetodil**

Pärmseente identifitseerimiseks kasutati täiendavalt veel API kit ID 32 C (*bioMérieux SA*, Prantsusmaa) testi. Enne testi sooritamist kasvatati identifitseeritavad pärmseened puhaskultuuridena SDA söötmetel. Pärast 24-48 h inkubeerimist valmistati söötmetassidel kasvanud pesadest API *Suspension Medium* ampulli (2 ml, 0,85% NaCl) *McFarland Standard* 2,0 hägususele vastav suspensioon. Seejärel pipeteeriti 250 µl suspensiooni API C *Medium* ampulli, millest pärast Vortex'il segamist 135 µl suspensiooni pipeteeriti igasse ID 32 C testriba süvendisse (sisaldavad 31 erinevat dehüdreeritud karbohüdraati). Testribale asetati kaas ning inkubeeriti temperatuuril 30 °C 48 tundi.

Pärast inkubeerimist võrreldi visuaalselt testriba iga süvendit kontrolliga (0) ning positiivsena (+) märgiti proovid, mille hägusus oli kontrolli hägususest suurem. Identifitseerimiseks kasutati *apiweb*<sup>TM</sup> identifikatsiooni tarkvara, kuhu sisestati saadud tulemused +/- kujul (erinevate suhkrute lõhustamise võime).

#### **2.2.11. Tulemuste statistiline analüüs**

Magistritöö katsete raames kogutud andmete salvestamiseks ja analüüsimiseks kasutati programmi *Microsoft Office Excel*. Tulemustevahelise erinevuse hindamiseks kasutati *Student t*-testi, millega arvutati p-väärtus. Erinevused loeti statistiliselt oluliseks, kui  $p < 0,05$ .

Tulemustevahelise seose hindamiseks leiti lineaarne korrelatsioonikordaja  $r$ . Seose tugevuse hindamisel arvestati, et  $0 < |r| \leq 0,3$  on nõrk seos,  $0,3 < |r| < 0,7$  on keskmise tugevusega seos ja  $0,7 \leq |r| < 1,0$  on tugev seos. Kui  $p < 0,05$ , loeti seos statistiliselt oluliseks.

Mikroobide elulemus näitab, kui suur osa algmaterjalis (enne lüofiliseerimist) esinenud mikroobidest jääb lüofiliseerimisjärgselt ellu. Elulemuse arvutamiseks kasutati valemit: lüofiliseerimisjärgne mikroobide arvukus / mikroobide arvukus algmaterjalis \* 100%.

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1. Mikroobide arvukus algmaterjalis ja lüofiliseeritud proovides

Magistritöö raames määrati kõigi katseseeriade käigus mikroobide arvukus algmaterjalis ehk esialgses teeseenes ja lüofiliseeritud teeseeneproovides (starterkultuurides). Kõigis proovides määrati bakterite üldarv ning pärmseente ja äädikhappebakterite arvukus. Mikroobide arvukuse määramine enne ja pärast lüofiliseerimist oli vajalik, et teha kindlaks, kui suur on mikroobide lüofiliseerimisjärgne elujõulisus erinevate krüoprotektorite kasutamisel.

Tabelis 5 on esitatud mikroobide üldarv katseseeriade KS I, KS II ja KS V käigus nii algmaterjalis kui ka lüofiliseeritud proovides. Kolmanda (KS III) ja neljanda (KS IV) katseseeria algmaterjalis oli mikroobide arvukus usalduspiiridesse jäävatest tulemustest madalam ( $< 1,48 \log \text{ PMÜ/g}$  ehk  $< 30 \text{ PMÜ}$ ), mistõttu antud katseseeriade tulemusi lähemalt ei analüüsita.

**Tabel 5.** Mikroobide arvukus katseseeriade I, II ja V algmaterjalis ning lüofiliseeritud proovides

Mikroob	KS	Algmaterjal (log PMÜ/g)	Lüofiliseeritud proovid (log PMÜ/g)			
			L-K	L-S	L-GL	L-GA
Bakterid	I	5,71	$< 2,48$	3,38	-	2,55
	II	6,99	4,76	3,77	4,08	4,16
	V	5,71	-	-	-	-
Pärmseened	I	6,02	-	3,31	-	$< 2,48$
	II	8,04	2,69	$> 3,34$	2,56	2,82
	V	6,05	-	-	-	-
Äädikhappe- bakterid	I	5,88	$< 2,48$	2,71	-	2,55
	II	4,81	2,56	3,82	2,85	4,09
	V	3,83	-	-	-	-

*Märkused:* KS – katseseeria, L-K – krüoprotektorita kontrollproov, L-S, L-GL, L-GA – erinevaid krüoprotektoreid (S – sahharoos, GL – glükoos, GA – galaktoos) sisaldavad lüofiliseeritud proovid, „-“ – mikroobe ei esinenud

Katsete tulemustest selgus oodatult, et nii bakterite üldarv kui ka pärmseente ja äädikhappebakterite arvukus oli algmaterjalis ehk esialgses teeseenes statistiliselt oluliselt suurem ( $p < 0,05$ ) kui lüofiliseeritud proovides. Bakterite üldarv oli algmaterjalis 5,71-6,99 log PMÜ/g, jäädes lüofiliseerimisjärgselt vahemikku 2,55-4,76 log PMÜ/g (elulemus 54,7-77,5%). Pärmseente ja äädikhappebakterite arvukus oli enne lüofiliseerimist vastavalt 6,02-8,04 log PMÜ/g ja 3,83-5,88 log PMÜ/g ning pärast lüofiliseerimist vastavalt 2,56-3,31 log PMÜ/g ja 2,55-4,09 log PMÜ/g. Nii oli elulemus pärmseentel 28,2-49,4% ja äädikhappebakteritel 52,9-68,6%. Tulemustest selgus, et pärmi elulemus vähenes kõige suuremas ulatuses. Varasemates teadustöodes on pärmseente lüofiliseerimisel saadud erinevaid tulemusi. Näiteks Polo jt. (2017) teadustöös tuvastati, et pärmseente keskmine elulemus oli lüofiliseerimisjärgselt 5,6% (*Pichia membranifaciens*, *Starmerella bacillaris* ja *Metschnikowia pulcherrima* elulemus oli üle 16%, aga ülejäänud pärmseente, sh. *S. cerevisiae* elulemus oli alla 5%), samas kui Berni ja Hennebert (1991) leidsid, et *S. cerevisiae* elulemus oli sõltuvalt krüoprotektorist 24-74%.

Äädikhappebakterite elulemus langeb kokku Maneesri jt. (2011) töö tulemustega, kus leiti, et äädikhappebakteri *Acetobacter aceti* TISTR102 lüofiliseerimiseelne arvukus oli 14,39 log PMÜ/g, aga pärast lüofiliseerimist oli see 9,44 log PMÜ/g. Autorite poolt avaldatud uurimuses oli äädikhappebakterite elulemus 65,6%, mis vastab käesolevas töös tuvastatud väärtuste vahemikule 52,9-68,6%.

Ilma krüoprotektorita kontrollproovis (L-K) oli lüofiliseerimisjärgselt mikroobide arvukus ( $\bar{x} = 3,34$  log PMÜ/g) suurem kui proovides, millele lisati krüoprotektoritena glükoosi (L-GL) ja galaktoosi (L-GA) (keskmine arvukus vastavalt 3,16 log PMÜ/g ja 3,23 log PMÜ/g) ( $p > 0,05$ ). Kui krüoprotektorina kasutati sahharoosi (L-S), oli mikroobide arvukus ( $\bar{x} = 3,40$  log PMÜ/g) suurem kui kontrollproovis (L-K), kuhu krüoprotektoreid ei lisatud ( $p > 0,05$ ). Tulemustest järeldati, et mikroobid säilitasid elujõulisuse paremini ilma krüoprotektorita kontrollproovides (L-K) ja proovides, mis sisaldasid sahharoosi (L-S). N'Guessan jt. (2016) leidsid, et sahharoos oli nende katses parim krüoprotektor pärmseente segu (*S. cerevisiae* F 12-7 ja *Candida tropicalis* C 0-7) lüofiliseerimisel samas, kui glükoos oli kõige halvem.

Saadud tulemustele tuginedes kasutati järgnevas neljas katseseerias (KS VI – KS IX) lüofiliseerimise ajal ühte krüoprotektoriga proovi (L-S – sahharoosi sisaldav proov) ja kontrollproovi (L-K), millele krüoprotektoreid ei lisatud. Ka antud katseseeriates

tulemustest selgus, et enne lüofiliseerimist oli kõigi mikroobide arvukus algmaterjalis statistiliselt oluliselt ( $p < 0,05$ ) suurem kui lüofiliseeritud proovides (tabel 6).

**Tabel 6.** Mikroobide arvukus katseseeriade VI, VIII ja IX algmaterjalis ning lüofiliseeritud proovides

Mikroob	KS	Algmaterjal (log PMÜ/g)	Lüofiliseeritud proovid (log PMÜ/g)	
			L-K	L-S
Bakterid	VI	6,33	< 1,48	-
	VIII	4,93	-	-
	IX	5,57	-	-
Pärmseened	VI	7,05	< 1,48	< 1,48
	VIII	5,02	-	-
	IX	5,88	-	-
Äädikhappe- bakterid	VI	4,83	-	< 1,48
	VIII	4,91	-	-
	IX	4,85	-	-

*Märkused:* KS – katseseeria, L-K – krüoprotektorita kontrollproov, L-S – proov, millele lisati krüoprotektorina sahharoosi, „-“ – mikroobe ei esinenud

Algmaterjalis oli mikroobide (bakterid, pärmseened, äädikhappebakterid) arvukus 4,83-7,05 log PMÜ/g, aga lüofiliseerimisjärgne mikroobide arvukus oli kõigis kolmes katseseerias väga madal – alla 1,48 log PMÜ/g.

KS VII tulemused loeti mitteusaldusväärsedeks, sest algmaterjalis oli mikroobide arvukus usalduspiiridesse jäävatest tulemustest madalam (söötmetassidel loendati < 30 PMÜ) ning neid tulemusi magistritöö analüüsidesse ei kaasatud.

Madal lüofiliseerimisjärgne mikroobide arvukus võib tuleneda sellest, et algmaterjalis oli mikroobide arvukus liiga väike. Morgan jt. (2006) soovitasid kasutada lüofiliseerimisel võimalikult kõrget esialgset mikroobirakkude kontsentratsiooni ( $> 1 \times 10^8$  rakku/ml ehk 8 log rakku/ml), aga käesoleva töö katsetes oli mikroobide esialgne arvukus tunduvalt väiksem. Lisaks võis madala arvukuse põhjuseks olla see, et teeseenest on raske mikroobe välja kasvatada nagu on kirjeldanud ka varasemad autorid Chen ja Liu (2001).

### 3.2. Mikroobide arvukus lüofiliseeritud teeseenest valmistatud jookides

*Kombucha* joogi valmistamiseks lisati lüofiliseeritud teeseenepulber (L-K, L-S, L-GA, L-GL) musta tee lahusesse ning viidi läbi 14 päeva pikkune fermentatsiooniprotsess. Kuna pärast fermentatsiooniprotsessi ei olnud uut teeseent moodustunud, teostati mikrobioloogilised analüüsid teelahusest, et teha kindlaks, kas teelahusesse lisatud mikroobid on säilitanud oma elujõulisuse. Kontrollproovina kasutati 10 päeva lüofiliseerimata teeseenega kääritatud *kombucha* jooki.

Tabelis 7 on toodud mikroobide arvukus lüofiliseeritud teeseeneproovidega 14 päeva kääritatud teelahustes ja kontrollproovides (*kombucha*). Esimese katseseeria käigus mikroobide arvukust 14 päeva käärinud teejookides ei määratud.

**Tabel 7.** Mikroobide arvukus katseseeriates II ja V 14 päeva lüofiliseeritud teeseeneproovidega kääritatud teelahustes ja kontrollproovis (*kombucha*)

Mikroob	KS	14 päeva kääritatud teelahused (log PMÜ/ml)				<i>Kombucha</i> (log PMÜ/ml)
		14-K	14-S	14-GL	14-GA	
Bakterid	II	> 5,48	> 5,48	4,94	4,91	5,88
	V	> 4,48	> 4,48	-	< 1,48	4,61
Pärmseened	II	-	-	-	-	> 4,48
	V	-	-	-	-	5,88
Äädikhapebakterid	II	> 5,48	5,4	4,68	4,23	4,17
	V	> 4,48	> 4,48	< 1,48	1,84	4,96

*Märkused:* KS – katseseeria, 14-K – krüoprotektorita kontrollproov, 14-S, 14-GL, 14-GA – erinevaid krüoprotektoreid (S – sahharoos, GL – glükoos, GA – galaktoos) sisaldavad proovid, „-“ – mikroobe ei esinenud

Kui KS II lüofiliseeritud proovides oli bakterite, pärmseente ja äädikhappebakterite arvukus 2,56-4,76 log PMÜ/g (tabel 5) ja kõik mikroobid olid säilitanud teatud määral oma elujõulisuse, siis 14 päeva kääritatud musta tee lahustes pärmseeni ei esinenud (proovid 14-K, 14-S, 14-GL, 14-GA, tabel 7). Seevastu KS II bakterite ja äädikhappebakterite arvukus (vastavalt 4,91-4,94 log PMÜ/ml ja 1,84-5,40 log PMÜ/ml) oli 14 päeva käärinud teelahustes suurem (äädikhappebakteritel  $p < 0,05$ ; bakteritel  $p > 0,05$ ) kui lüofiliseeritud proovides, kus bakterite üldarv oli 2,55-4,76 log PMÜ/g ja äädikhappebakterite arvukus 2,55-4,09 log PMÜ/g. See näitab, et bakterid võisid olla võimelised pärast lüofiliseerimist mustas tees edasi kasvama. Hoolimata kõrgeist bakterite arvukusest ei esinenud üheski KS



II teelahuses (14-K, 14-S, 14-GL, 14-GA) käärimise tunnuseid – lahuste värvus oli tunduvalt tumedam kui kontroll *kombucha* proovil ja käärinud lõhna ei esinenud. Põhjuseks võib olla see, et kõik fermentatsiooniprotsessis olulist rolli mängivad mikroobid ei olnud võimelised säilitama oma elujõulisust. Kuna KS V lüofiliseeritud proovidest söötmetassidele mikroobipesasid ei kasvanud (tabel 5), aga 14 päeva käärinud teelahustes olid mikroobid (bakterid, äädikhappebakterid) olemas (tabel 7), siis võib oletada, et mikroobid võisid sattuda 14 päeva vanustesse teelahustesse ümbritsevast keskkonnast. Ka KS V proovidel ei esinenud käärimise tunnuseid.

Kontrollproovis (traditsiooniline *kombucha*) oli mikroobide arvukus suurem kui lüofiliseeritud proovidega kääritatud jookides (14-K, 14-S, 14-GL, 14-GA, tabel 7), v.a. KS II, kus äädikhappebaktereid oli lüofiliseeritud materjaliga kääritatud proovides rohkem. Väiksem äädikhappebakterite arvukus kontrollproovis (*kombucha*) võis olla KS II ajal tingitud sellest, et protsessi käigus moodustus *kombucha* pinnale uus teeseen, mis takistas hapniku juurdepääsu kasvulahuses esinevatele äädikhappebakteritele. Lüofiliseeritud proovidega kääritatud teelahuste pinnale teeseeni ei moodustunud ning tänu sellele oli ka äädikhappebakterite jaoks kasvukeskkond soodsam. Samas, V KS-s oli kontrollproovis (*kombucha*) äädikhappebakterite arvukus suurem kui II KS kontrollproovis, kuigi antud katseseerias moodustus samuti uus teeseen.

Katseseeriates VI-IX suurendati teelahusesse lisatava lüofiliseeritud proovi kogust (1 g asemel 5 g) ja vähendati teelahuse kogust (500 ml asemel 300 ml), et aidata paremini kaasa fermentatsiooniprotsessi toimumisele ja teeseene moodustumisele. Kontrollproovidena kasutati 10 päeva samades tingimustes käärinud *kombucha* jooke. KS-s VI oli lüofiliseeritud proovides mikroobide arvukus väga väike ( $< 1,48 \text{ PMÜ/g}$ ) (tabel 6) ja mõnes proovis puudus kasv täielikult (bakterid proovis 14-S ja äädikhappebakterid proovis 14-K), aga kõigis 14 päeva käärinud proovides oli mikroobide olemasolu tuvastatav (tabel 8).

**Tabel 8.** Mikroobide arvukus katseseeriates VI, VIII ja IX 14 päeva lüofiliseeritud teeseeneproovidega kääritatud teelahustes ja kontrollproovis (*kombucha*)

Mikroob	KS	14 päeva kääritatud teelahused (log PMÜ/ml)		<i>Kombucha</i> (log PMÜ/ml)
		14-K	14-S	
Bakterid	VI	> 4,48	4,09	5,17
	VIII	-	> 5,48	5,48
	IX	-	4,18	4,95
Pärmseened	VI	> 6,48	< 3,48	< 3,48
	VIII	-	> 5,48	5,76
	IX	-	4,77	5,54
Äädikhappebakterid	VI	5,14	5,64	6,05
	VIII	-	3,95	5,02
	IX	-	-	-

*Märkused:* KS – katseseeria, 14-K – krüoprotektorita kontrollproov, 14-S – proov, millele lisati krüoprotektorina sahharoosi, „-“ – mikroobe ei esinenud

Katseseeriates VIII ja IX ei täheldatud lüofiliseeritud proovides (L-K ja L-S) mikroobide kasvu (tabel 6), aga kääritatud teelahustes (proov 14-S) olid mikroobid olemas. Seevastu krüoprotektorita lüofiliseeritud proovi kasutamisel (proov L-K) puudus mikroobide (bakterid, äädikhappebakterid, pärmseened) kasv 14-K proovides mõlemas katseseerias. Mikroobide kasvu puudumine proovis 14-K (KS VIII) on segadust tekitav, sest lüofiliseeritud proovi abil kääritatud teelahus oli muutunud värvuselt heledamaks, tunda oli käärinud lõhna ja lahuse pH oli langenud (esialgselt pH väärtuselt 7,23 väärtuseni 3,26; tabel 9). Käärimisprotsessi võisid antud juhul esile kutsuda keskkonnast pärinevad mikroobid, kelle isoleerimiseks ei sobinud katsete käigus kasutatud agarsöötmed või mikroobid, kes olid seotud teelahuste sisse lisatud bakteriaalse tselluloosiga, kuid kes ei kandunud tselluloosist üle teelahusesse.

**Tabel 9.** 14 päeva kääritatud teelahuste ja kontrollproovide (*kombucha*) pH väärtused

KS	14 päeva käärinud teelahuste pH		<i>Kombucha</i> pH
	14-K	14-S	
VIII	3,26	3,87	2,97
IX	3,33	4,55	2,54

*Märkused:* KS – katseseeria, 14-K – krüoprotektorita kontrollproov, 14-S – proov, millele lisati krüoprotektorina sahharoosi

Üheksandas katseseerias olid mõlemad lüofiliseeritud teeseeneproovidega kääritatud teelahused (14-K ja 14-S) hallitusega saastunud. Hallitus kasvas ka söötmetassidel, mistõttu oli bakterite, äädikhappebakterite ja pärmseente kasv söötmetel häiritud. Hallituse eosed võisid sattuda proovidesse ümbritsevast keskkonnast – lüofilisaatorist või laborist. Võõrmikroobide kasvu soodustas kindlasti see, et starterkultuuriga teelahusesse viidud mikroobide kogus oli väike ning seetõttu ei langenud lahuse pH piisavalt kiiresti. Tulemustest on näha, et KS IX ajal oli pH võrreldes musta tee ja suhkru lahusega (pH 7,23) langenud, ehkki pH langus oli väiksem kui VIII KS vastavate proovide puhul (tabel 9). Nii KS VIII kui ka KS IX lüofiliseeritud teeseentega kääritatud proovides oli pH kõrgem kui *kombucha* kontrollproovis.

Sahharoosi kasutamisel krüoprotektorina katseseeriates VI, VIII ja IX, säilis mikroobide elujõulisus paremini kui ilma krüoprotektorita proovides (14-K) (tabel 8), aga võrreldes kontrollprooviga (*kombucha*) oli proovides 14-S mikroobide arvukus statistiliselt oluliselt madalam ( $p < 0,05$ ).

Korrelatsioonanalüüsi tulemusena selgus, et teelahusesse lisatud proovi koguse ja mikroobide arvukuse (14 päeva käärinud jookides) vahel on vaid nõrk positiivne seos ( $r = 0,16$ ;  $p > 0,05$ ) ehk suurema proovi koguse lisamisel teelahusesse oli mikroobide arvukus 14 päeva käärinud jookides suurem. Teelahuse koguse ja 14 päeva käärinud jookide mikroobide arvukuse vahel täheldati nõrka negatiivset seost ( $r = -0,16$ ;  $p > 0,05$ ) ehk väiksema teelahuse koguse kasutamisel oli mikroobide arvukus 14 päeva käärinud teelahustes suurem. Visuaalsel vaatlusel aga ei esinenud katseseeriates VI-IX (suurem proovi kogus, väiksem teelahuse kogus) sarnaselt esimeste katseseeriatega (väiksem lisatud proovi kogus, suurem teelahuse kogus) käärimistunnuseid või esines neid vähesel määral ning mikroobide arvukus proovides oli vastuoluline – lüofiliseeritud proovides mikroobid puudusid või neid oli väga vähe, aga 14 päeva käärinud proovides oli mikroobide kasv olemas. Kirjeldatud seoste statistilise olulisuse suurendamiseks ja konkreetsete järelduste tegemiseks on vaja viia läbi rohkem katseseeriaid ning kasutada rohkem proove.

### 3.3. Pärmseente identifitseerimine ja morfoloogia

Katseseeriade I, II, V, VI, VIII ja IX käigus isoleeriti 24 pärmseent, kellest 16 prooviti identifitseerida. Identifitseerimiseks valiti iga katseseeria ajal erinevate morfoloogiliste tunnustega pärmid nii algmaterjalist, lüofiliseeritud proovidest kui ka 14 päeva käärinud teelahustest. Pärmseente identifitseerimisel kasutati tulemuste usaldusväärsuse suurendamiseks paralleelselt API kit ID 32 C testi ja MALDI-TOF analüüsi (analüüsid teostati kahes erinevas laboris). Kuna API kit ID 32 C testi tulemuste hindamine visuaalselt on keeruline ja pigem subjektiivne, siis analüüside tulemuste erinevuse korral loeti olulisemaks MALDI-TOF analüüsi tulemus.

Algmaterjalis ehk teeseenes esinesid analüüside tulemuste kohaselt pärmseened neljast erinevast liigist: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Candida rugosa* ja *C. magnoliae*, aga lüofiliseeritud proovides tuvastati vaid *S. cerevisiae* (tabel 10). Lüofiliseeritud proovide abil kääritatud teelahustest leiti ainult pärmseen liigist *C. rugosa*, keda leiti ka algmaterjalist ja 10 päeva käärinud *kombucha* kontrollproovidest. *Kombucha* kontrollproovidest identifitseeriti lisaks veel *S. cerevisiae*, *C. magnoliae* ja *Zygosaccharomyces microellipsoides*. Saadud tulemuste põhjal on keeruline teha järeldusi, sest erinevates katsetappides leiti proovidest erinevad pärmseente liigid. Ainus mikroob, keda esines nii algmaterjalis, *kombucha*'s kui ka 14 päeva käärinud teelahustes, oli *C. rugosa*. Tegemaks kindlaks, kas mikroobide liigid on võimelised kasvama kõigis katsetappides, on vaja proovidest isoleerida ja identifitseerida rohkem pärmseeni ning kasutada efektiivsemaid isoleerimis- ja identifitseerimismeetodeid.

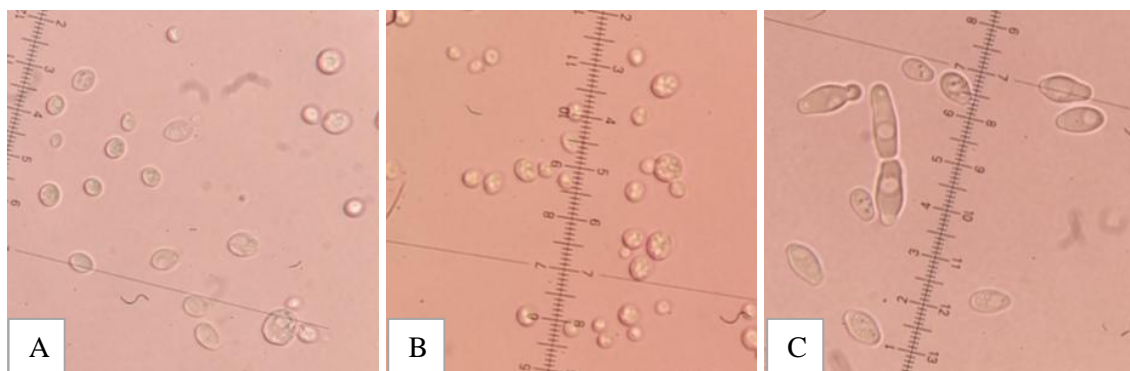
**Tabel 10.** Pärmseente identifitseerimise tulemused

Proov	KS	Nr.	MALDI-TOF analüüs	API kit test	Identifitseerimise tulemus
AM	I	1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	I	2	<i>S. ludwigii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. ludwigii</i>
	II	7	<i>S. cerevisiae</i>	Vaste puudub	<i>S. cerevisiae</i>
	V	51	Vaste puudub	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>
	VI	60	Vaste puudub	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>
	IX	88	Vaste puudub	<i>C. magnoliae</i>	<i>C. magnoliae</i>
L-S	I	5	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	II	9	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
L-GL	II	11	<i>S. cerevisiae</i>	Vaste puudub	<i>S. cerevisiae</i>
L-GA	II	10	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
14-TS	II	21	<i>S. cerevisiae</i>	Vaste puudub	<i>S. cerevisiae</i>
	VI	64	Vaste puudub	<i>C. magnoliae</i>	<i>C. magnoliae</i>
	VI	70	<i>Z. microellipsoides</i>	Vaste puudub	<i>Z. microellipsoides</i>
	VIII	91	Vaste puudub	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>
14-S	VI	72	Vaste puudub	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>
	VIII	92	Vaste puudub	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>

Märkused: KS – katseseeria, Nr. – isolaadi number, AM – algmaterjal, L – lüofiliseeritud proovid (starterkultuurid), 14 – 14 päeva kääritatud teelahused, S, GL, GA – erinevaid krüoprotektoreid (S – sahharoos, GA – galaktoos, GL – glükoos) sisaldavad proovid, TS – kontrollproov (*kombucha*)

Teeseene süsteemist on ka varasemates teadustöodes leitud pärmseeni liikidest *S. cerevisiae* (Chakravorty jt. 2016, Coton jt. 2017, Tran jt. 2020a), *Z. microellipsoides* (*Torulaspora microellipsoides*) (Coton jt. 2017) ja *S. ludwigii* (Ramadani, Abulreesh 2010). Pärmiliike *C. rugosa* ja *C. magnoliae* ei ole seni teadaolevalt teeseene süsteemis kirjeldatud.

*S. cerevisiae* kolooniad SDA agarsöötmele olid valged, ümara kujuga, pealt kumerad ning läikiva või tuhmi pinnaga. Mikroobi rakud olid ovaalsed, sileda või veidi kandilise servaga ja suurusega 2-6 x 2-10 µm (laius x pikkus) (joonis 5A). *Z. microellipsoides*'e kolooniad olid samuti valged, ümara kujuga ning kumera, läikiva pinnaga. Proovidest isoleeritud *Z. microellipsoides*'e rakud olid ovaalsed ja nende suurus jäi vahemikku 1-6 x 1-8 µm (joonis 5B). Nii *S. cerevisiae* kui ka *Z. microellipsoides*'e rakkudel oli ainult üks pung. Tulemused sarnanevad Brimacombe jt. (2020) uurimistöö tulemustega, kus *Z. microellipsoides*'e kolooniad olid samuti ümara kujuga ja valged ning mikroobi rakud olid ovaalse kujuga.



**Joonis 5.** Proovidest isoleeritud pärmseened: A – *S. cerevisiae* (proov KS I nr. 1, AM), B – *Z. microellipsoides* (proov KS VI nr. 70, 14-TS), C – *S. ludwigii* (proov KS I nr. 2, AM).

SDA söötmetassidele kasvanud *S. ludwigii* kolooniad olid valged, ümarad ning kumera, tuhmi pinnaga. Pärmirakumorfoloogia erines märgatavalt nii *S. cerevisiae* kui ka *Z. microellipsoides*'e rakkude morfoloogiast. *S. ludwigii* rakud olid pikliku kujuga, keskest laiemad ning pungumine toimus kahes suunas (pungad moodustusid raku otstes täpselt teineteise vastu) (joonis 5C). *S. ludwigii* rakumorfoloogia kirjeldus sarnaneb Miyakawa jt. (2012) uurimistöö tulemustega.

Nii *C. rugosa* kui ka *C. magnoliae* kolooniad olid valged, ümara kujuga ja kumera, läikiva pinnaga. Mikroobide rakud olid pikliku kujuga, kitsaste või kandiliste otstega, suurusega 1-6 x 1-11 µm. Saadud tulemused erinevad aga varasemate teadustööde tulemustest. Adjapong jt. (2016) uurimistöös olid SDA söötmele kasvanud *C. rugosa* kolooniad küll valged, aga kurrulised ja madalad. *C. magnoliae* rakud olid Cascio jt. (2007) uurimistöös ümarad, mitte piklikud. Morfoloogiliste tunnuste põhjal ei pruugi *C. rugosa* ja *C. magnoliae* identifitseerimise tulemused vastata tõele. API kit ID 32 C andmebaas on väike ja ka tulemuste hindamine hägususe alusel on keeruline ning seetõttu võib saada mitteusaldusväärsed tulemused. MALDI-TOF analüüsi käigus ei õnnestunud nimetatud mikroobe identifitseerida (andmebaasis puudusid sobivad vasted).

### 3.4. Äädikhappebakterite identifitseerimine ja morfoloogia

Äädikhappebakterite identifitseerimiseks saadeti 21 isolaati (KS I, II, V, VI, VIII, IX) paralleelselt kahte erinevasse laborisse, kus viidi läbi MALDI-TOF analüüs. Analüüside käigus identifitseeriti erinevaid mikroobe, keda ei ole teadaolevalt teeseene süsteemist

varem leitud: *Staphylococcus warneri*, *Paenibacillus pabuli*, *Bacillus circulans*, *Sphingobium yanoikuyae* (tabel 11). Äädikhappebaktereid ei tuvastatud aga mitte üheski isolaadis ning 13 isolaati ei olnud võimalik MALDI-TOF analüüsi abil identifitseerida (mikroobidele puudusid masina andmebaasis sobivad vasted).

**Tabel 11.** MALDI-TOF analüüsi tulemused

Proov	KS	Nr.	MALDI-TOF analüüs 1*	MALDI-TOF analüüs 2	Tulemus
AM	VI	61	<i>St. warneri</i>	<i>St. warneri</i>	<i>St. warneri</i>
L-GL	II	18	<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>P. pabuli</i>	<i>P. pabuli</i>
14-K	V	67	<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. circulans</i>	<i>B. circulans</i>
	V	68	<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. circulans</i>	<i>B. circulans</i>
14-S	II	30A	<i>Sp. yanoikuyae</i>	<i>Sp. yanoikuyae</i>	<i>Sp. yanoikuyae</i>
	II	32	<i>Sp. yanoikuyae</i>	<i>Sp. yanoikuyae</i>	<i>Sp. yanoikuyae</i>
	V	65	<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. circulans</i>	<i>B. circulans</i>
	V	66	<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. circulans</i>	<i>B. circulans</i>

*Märkused:* KS – katseseeria, Nr. – isolaadi number, AM – algmaterjal, L – lüofiliseeritud proov (starterkultuur), 14 – 14 päeva kääritatud teelahused, S, GL – erinevaid krüoprotektoreid (S – sahharoos, GL – glükoos) sisaldavad proovid, K – krüoprotektorita kontrollproov, \*analüüs 1 ja 2 – analüüsid teostatud vastavalt Tartu Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis ja Tallinnas Terviseameti Nakkushaiguste Laboris

GYCA agarsöötmetele kasvanud mikroobidest õnnestus identifitseerida vaid mõned üksikud liigid. Lisaks olid analüüside tulemuste kohaselt nii algmaterjalis, lüofiliseeritud proovides kui ka 14 päeva kääritatud jookides erinevad mikroobid, mistõttu on keeruline luua seoseid erinevates proovides esinevate mikroobide vahel ning teha kindlaks, kas tegemist võib olla proovides juhuslikult esinevate või teeseene süsteemi kuuluvate mikroobidega.

GYCA söötmetassidel kasvasid peamiselt spoore mitte moodustavad gramnegatiivsed kõvera/paindunud kujuga pulkbakterid, kes paiknesid üksikult, paarikaupa või ahelates. Üksikutel juhtudel paiknesid bakterirakud ahelates, mis moodustasid pikad niidid. Pulkbakterite suurus jäi vahemikku  $\leq 1 \times 2-15 \mu\text{m}$ . Rakumorfoloogia põhjal võiks arvata, et tegemist on äädikhappebakteritega, sest äädikhappebakterid on gramnegatiivsed või gramvarieeruvad, spoore mitte moodustavad ellipsoidsed kuni vardakujulised rakud, mis paiknevad üksikult, paarides või lühikestes ahelates (Mamlouk, Gullo 2013). Identifitseerimise käigus aga ei tuvastatud äädikhappebakterite esinemist kirjeldatud rakumorfoloogiaga isolaatides.

*P. pabuli* on endospore moodustav grampositiivne pulkbakter (Lorentz jt. 2006, Kao jt. 2007). Proovid, mis identifitseeriti käesolevas töös kui *P. pabuli*, olid aga spore mitemoodustavad, gramnegatiivsed kõverad/paindunud pulkbakterid suurusega  $1 \times 2-8 \mu\text{m}$ . Morfoloogia põhjal on võimalik, et identifitseerimise tulemused ei vasta tõele ning arvatavasti on proovidest isoleeritud mikroobide näol tegemist siiski äädikhapebakteritega.

*B. circulans* on grampositiivne või gramvarieeruv, liikuv, sirge, ümarate otstega pulkbakter, mille läbimõõt on  $0,6-0,8 \mu\text{m}$  (Fraco jt. 2001, Logan, De Vos 2009). Mikroobi rakud paiknevad üksikult või paarikaupa ning aeg-ajalt ka lühikestes ahelates (Logan, De Vos 2009). Käesolevas töös isoleeritud mikroobide morfoloogia erineb *B. circulans* morfoloogiast eelkõige selle poolest, et kõigis neljas proovis, mis identifitseeriti kui *B. circulans*, olid gramnegatiivsed painduvad/kõverad rakud. Kahe proovi puhul oli eripäraks ka see, et rakud paiknesid ahelates, mis moodustasid pikad niidid.

*Sp. yanoikuyae* on gramnegatiivne, lühike, spore mitte moodustav pulkbakter (Feng jt. 2018, Wang jt. 2018), kelle mõõdud on ligikaudu  $0,4-0,6 \times 1,1-2,6 \mu\text{m}$  (Feng jt. 2018). Magistritöö raames isoleeritud mikroobid on morfoloogia poolest sarnased, aga rakkude suurus on erinev ( $1 \times 2-7 \mu\text{m}$ ).

Ühes proovis esinesid ka grampositiivsed kokid läbimõõduga  $1 \mu\text{m}$ , kes paiknesid üksikult, väikestes kobarates või lühikestes ahelates. Kokid identifitseeriti kui *St. warneri*.

MALDI-TOF andmebaas on küllaltki väike, optimeeritud vastavalt labori spetsiifikale ja äädikhapebaktereid on andmebaasis vähe, mistõttu analüüsitulemused võivad olla eksitavad. Lisaks on äädikhapebaktereid väga keeruline isoleerida ja identifitseerida (Sengun, Karabiyikli 2011). Selleks, et saada äädikhapebakterite identifitseerimisel usaldusväärseid tulemusi, on soovitatav kasutada molekulaarset analüüsi ja saadud tulemusi võrrelda referentsliikidega (Gomes jt. 2018).



## KOKKUVÕTE

Magistritöös anti vastavalt eesmärgile ülevaade teeseene süsteemist, selles leiduvatest mikroobidest, mikroobidevahelistest suhetest ning teeseene süsteemi kuuluvate mikroobide ja bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimise võimalustest. Eksperimentaalses osas uuriti, kas lüofiliseeritud teeseent saab kasutada *kombucha* starterkultuurina. Selleks määrati kõigi katsete vältel bakterite üldarv, äädikhapebakterite ja pärmseente arvukus, kirjeldati mikroobide morfoloogiat, identifitseeriti isoleeritud mikroobid ning hinnati lüofiliseeritud proovide abil kääritatud jookide väliseid omadusi.

Teeseene lüofiliseerimine langetas mikroorganismide elulemust märgatavalt. Samas, lüofiliseeritud proovide abil kääritatud teelahustes oli mikroobide arvukus suurem kui lüofiliseeritud proovides, mis näitab, et mikroobid võisid olla võimelised säilitama oma elujõulisuse lüofiliseerimisprotsessi käigus ja kasvama edasi ka teelahustes. Võimalik on ka see, et mikroobid sattusid 14 päeva käärinud teelahustesse ümbritsevast keskkonnast.

Starterkultuuri valmistamisel lisati teeseenemassile erinevaid krüoprotektoreid, mille seast kõige efektiivsemaks osutus sahharoos. Sahharoosi kasutamisel oli mikroobide keskmine arvukus suurem ( $p > 0,05$ ) kui teistes proovides (krüoprotektorita proov ning proovid, millele lisati krüoprotektoritena glükoosi ja galaktoosi).

Suuremas osas lüofiliseeritud teeseeneproovide abil kääritatud teelahustes puudusid käärimise tunnused (käärinud lõhn ja heledam värvus) ning sellest tulenevalt järeldati, et lüofiliseeritud teeseen ei toiminud starterkultuurina nii nagu vaja, kuigi mikroobide arvukuse põjal võiks järeldada vastupidist (arvukus oli teelahustes suurem kui lüofiliseeritud proovides). Arvatavasti ei saadud lüofiliseeritud teeseenest *kombucha*'le iseloomulike tunnustega jooki sellepärast, et mõned *kombucha* fermentatsiooniprotsessis olulist rolli mängivad mikroobid ei säilitanud lüofiliseerimise käigus elujõulisust. Mikroobide elujõulisuse parandamiseks võiks muuta lüofiliseerimiselset mikroobirakkude kontsentratsiooni ja lüofiliseerimise tingimusi.

Algmaterjalist identifitseeriti pärmseened liikidest *S. cerevisiae*, *S. ludwigii*, *C. rugosa* ja *C. magnoliae*, lüofiliseeritud proovidest *S. cerevisiae* ning lüofiliseeritud proovide abil

kääritatud jookidest *C. rugosa*. Bakteritest tuvastati *St. warneri*, *P. pabuli*, *B. circulans* ja *Sp. yanoikuyae*, aga ei ühtegi äädikhappebakterit. Kuna isoleerida õnnestus vähe pärmseeni ja baktereid ning erinevates katseetappides esinesid proovides erinevad mikroobid, ei saa antud tulemuste põhjal teha järeldusi lüofiliseeritud teeseeneproovide efektiivsuse kohta *kombucha* starterkultuurina. Isoleeritud mikroobide morfoloogia analüüsimisel selgus ka, et mikroobide identifitseerimise tulemused MALDI-TOF ega API kit ID 32 C meetodil ei ole usaldusväärsed, mistõttu edasistes uuringutes tuleks eelistada liikide molekulaarseid tuvastusmeetodeid.

Magistritöö katsete raames saadud tulemusi ja katsete teostamise käigus tekkinud uusi ideid saab kasutada järgnevides uurimistöödes tööstusliku *kombucha* starterkultuuri väljatöötamiseks. Esmalt on aga vaja lahendada mitmed probleemid: lihtsustada *kombucha* tootmise metoodikat laboratoorsetes tingimustes; teha kindlaks teeseene süsteemi mikroobidele optimaalsed kasvutingimused; kasutada sobivamaid meetodeid mikroobide isoleerimiseks teeseene süsteemist ja isoleeritud mikroobide identifitseerimiseks; tuvastada *kombucha* fermentatsiooniprotsessi oluliseimad mikroobid ja nende tähtsus toote omaduste kujundamisel; testida teeseene süsteemist isoleeritud puhaskultuuride omavahelist sobivust; optimeerida lüofiliseerimise tingimusi ning lahendada bakteriaalse tselluloosi lüofiliseerimisega seotud probleemid.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- \* **Bond, C.** (2007). Cryopreservation of Yeast Cultures. – *Meth. Mol. Biol.* Vol. 368, pp. 109–118, viidatud: **Kupletskaya, M. B., Netrusov, A. I.** (2011). Viability of Lyophilized Microorganisms after 50Year Storage. – *Mikrobiology*. No. 6, pp. 850-853 vahendusel.
- \* **Kupletskaya, M. B., Arkad'eva, Z. A.** (1997). Long Term Maintenance of Microorganisms in the Culture Collection of the Microbiology Department of the Moscow State University. – *Mikrobiologiya*. Vol. 66, No. 2, pp. 283–288, viidatud: **Kupletskaya, M. B., Netrusov, A. I.** (2011). Viability of Lyophilized Microorganisms after 50Year Storage. – *Mikrobiology*. No. 6, pp. 850-853 vahendusel.
- \* **Reiss, J.** (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. – *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*. No. 3, pp. 258–261, viidatud: **Cvetković, D., Ranitović, A., Savić, D., Joković, N., Vidaković, A., Pezo, L., Markov, S.** (2019). Survival of Wild Strains of Lactobacilli During Kombucha Fermentation and Their Contribution to Functional Characteristics of Beverage. – *Pol. J. Food Nutr. Sci.* No. 4, pp. 407-415 vahendusel.
- \* **Teyssier, C., Hamdouche, Y.** (2016). Acetic Acid Bacteria: Prospective Applications in Food Biotechnology. Northwestern, FL: CRC Press. 413 lk, viidatud: **Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H., Escalante-Aburto, A.** (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. – *CyTA - Journal of Food*. No. 1, pp. 390-399 vahendusel.
- Adebayo, Olajumoke.** 2018. Evaluation of bacterial polymers as protective agents for sensitive probiotic bacteria. Doctoral thesis. Faculty of Science and Engineering, University of Wolverhampton. Wolverhampton. 268 lk.
- Adjapong, G., Bartlett, M., Hale, M., Garrill, A.** (2016). The isolation of *Candida rugosa* and *Candida mesorugosa* from clinical samples in Ghana. – *Medical Mycology*. No. 54, pp. 322-326.
- Aidoo, K. E., Nout, M. J. R., Sarkar, P. K.** (2006). Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. – *FEMS Yeast Res.* No. 6, pp. 30-39.
- Al- Kalifawi, E. J., Hassan, I. A.** (2014). Factors Influence on the yield of Bacterial Cellulose of Kombucha (Khubdat Humza). - *Baghdad Science Journal*. No. 11, pp. 1420-1428.
- Ali, S. A., Shivanna, G. B.** (2017). Physico-chemical characteristics of russian tea fungus: kombucha. – *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. No. 4, pp. 161-165.

- Berni, J.- F., Hennebert, G. L.** (1991). Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. – *Mycologia*. No. 83, pp. 805-815.
- Best, B. P.** (2015). Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. – *Rejuvenation research*. No. 5, pp. 422-436.
- Bhattacharya, S.** (2018). Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. – *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. Pp. 7-19.
- Brimacombe, C. A., Sierocinski, T., Dahabieh, M. S.** (2020). A white-to-opaque-like phenotypic switch in the yeast *Torulaspora microellipsoides*. – *Communications Biology*. No. 86, pp. 1-12.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P.** (2002). Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. – *Biotechnology Letters*. No. 24, pp. 1587-1591.
- Cascio, G. L., Ligozzi, M., Carbonare, L. D.** (2007). First Case of Bloodstream Infection Due to *Candida magnoliae* in a Chinese Oncological Patient. – *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 45, No. 10, pp. 3470-3473.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., Gachhu, R.** (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical Dynamics. – *International Journal of Food Microbiology*. No. 220, pp. 63-72.
- Chanyuan, Y., Xiaoli, Z., Daidi, F., Yu, M., Yan'e, L., Junfeng, H., Ran, S.** (2012). Optimizing the Chemical Compositions of Protective Agents for Freeze-drying *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920. – *Chinese Journal of Chemical Engineering*. No. 20, pp. 930-936.
- Chawla, P. R., Survase, S. A., Bajaj, I. B., Singhal, R. S.** (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. – *Food Technol. Biotechnol.* No. 47, pp. 107-124.
- Chen, C., Liu, B. Y.** (2001). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. – *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 89, pp. 834-839.
- Chen, H.-C., Lin, C.-W., Chen, M.-J.** (2006). The Effects of Freeze Drying and Rehydration on Survival of Microorganisms in Kefir. – *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* No. 1, pp. 126-130.
- Chotiko, A., Sathivel, S.** (2014). Effects of enzymatically-extracted purple rice bran fiber as a protectant of *L. plantarum* NRRL B-4496 during freezing, freeze drying, and storage. – *LWT - Food Science and Technology*. No. 59, pp. 59-64.
- Clasen, C., Sultanova, B., Wilhelms, T., Heisig, P., Kulicke, W.-M.** (2006). Effects of Different Drying Processes on the Material Properties of Bacterial Cellulose Membranes. – *Macromolecular Symposia*. No. 1, pp. 48-58.
- Conde-Islas, A., Á., Jiménez-Fernández, M., Cantú-Lozano, D., Urrea-García, G. R., Luna-Solano, G.** (2019). Effect of the Freeze-Drying Process on the Physicochemical and Microbiological Properties of Mexican Kefir Grains. – *Processes*. No. 7, pp. 1-15.

- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume- Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., Coton, E.** (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. - *FEMS Microbiology Ecology*. No. 5.
- Criste, A., Giuburuncă, M., Negrea, O., Dan, S., Zăhan, M.** (2014). Research Concerning Use of Long-Term Preservation Techniques for Microorganisms. - *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*. No. 47, pp. 73-77.
- Cvetković, D., Ranitović, A., Savić, D., Joković, N., Vidaković, A., Pezo, L., Markov, S.** (2019). Survival of Wild Strains of Lactobacilli During Kombucha Fermentation and Their Contribution to Functional Characteristics of Beverage. - *Pol. J. Food Nutr. Sci.* No. 4, pp. 407-415.
- Dutta, H., Paul, S. K.** (2019). Production and Management of Beverages: Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. Vol. 1: The Science of Beverages. Woodhead publishing, elsevier. Pp.259-288.
- El-Salam, S. S. A.** (2012). 16S rRNA Gene Sequence Detection of Acetic Acid Bacteria Isolated from Tea Kombucha. – *New York Science Journal*. No. 5, pp. 55-61.
- Feng, L., Liu, H., Cheng, D., Mao, X., Wang, Y., Wu, Z., Wu, Q.** (2018). Characterization and Genome Analysis of a Phthalate Esters-Degrading Strain *Sphingobium yanoikuyae* SHJ. – *BioMed Research International*. Pp. 1-8.
- Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., Ercolini, D.** (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. – *Food Microbiology*. No. 73, pp. 11-16.
- Fraco, A. T, Fraco, M.-L. T.-K., Fraca, C. M., Fraco, I. McA.** (2001). *Bacillus circulans* endophthalmitis. – *Clinical and Experimental Ophthalmology*. No. 29, pp. 92-93.
- Fuller, B. J.** (2004). CRYOPROTECTANTS: THE ESSENTIAL ANTIFREEZES TO PROTECT LIFE IN THE FROZEN STATE. – *CryoLetters*. No. 6, pp. 375-388.
- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejía, J. L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G., Gioia, D.** (2019). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. – *Nutrients*. No. 11, pp. 1-22.
- Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., Nirgude, P. S.** (2015). LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING – A REVIEW. – *World Journal of Pharmaceutical Research*. Vol. 4, pp. 516-543.
- Gangurde, J. S., Erande, K. B, Shevale, M. L.** (2019). FREEZE DRYING: A REVIEW. – *World Journal of Pharmaceutical Research*. Vol. 8, pp. 592-603.

- Gomes, R. J., Borges, M. F., Rosa, M. F., Castro-Gómez, R. J. H., Spinosa, W. A.** (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. – *Food Technology & Biotechnology*. Vol. 56, No. 2, pp. 139-151.
- Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Xindi, Y., Gumienna, M.** (2016). Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. – *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* No. 4, pp. 447-457.
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., Ledford, R. A.** (2000). Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. – *Journal of Food Protection*. No. 7, pp. 976-981.
- Heylen, K., Hoefman, S., Vekeman, B., Peiren, J., Vos, P.** (2012). Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. – *Appl Microbiol Biotechnol.* No. 94, pp. 565-574.
- Hubalek, Z.** (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. – *Cryobiology*. No. 43, pp. 205-229.
- Hussin, A. S. M., Sapawi, C. W. N. S. C. W., Osman, F. A., Muhamad, R., Sukor, R.** (2015). Effects of sugar sources and incubation time on the properties of tea fungus (Kombucha) beverage. – *J Prob Health*. Vol. 3, pp. 66.
- Jagannath, A., Raju, P. S., Bawa, A. S.** (2010). Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. – *LWT - Food Science and Technology*. No. 43, pp. 1197-1203.
- Jakubczyk, K., Kalduńska, J., Kochman, J., Janda, K.** (2020). Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. – *Antioxidants*. No. 9, pp. 1-15.
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Sathishkumar, M.** (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. – *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. No. 4, pp. 538-550.
- Jayabalan, R., Sathishkumar, M., Malini, K., Yun, S.- E., Swaminathan, K.** (2010). Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. – *Food Sci. Biotechnol.* No. 19, pp. 1-5.
- Kao, P.-M., Chen, C.-I., Huang, S.-C., Chang, Y.-C., Tsai, P.-J., Liu, Y.-C.** (2007). Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. – *Biochemical Engineering Journal*. No. 34, pp. 172-178.
- Kawasaki, H., Shimanouchi, T., Kimura, Y.** (2019). Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. – *Journal of Chemistry*. Pp. 1-14.
- Kayisoglu, S., Coskun, F.** (2020). Determination of physical and chemical properties of kombucha teas prepared with different herbal teas. – *Food Science and Technology*. Pp. 1-5.

- Keshk, S.** (2014). Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. - *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. Vol. 4, pp. 1-10.
- Kongruang, S.** (2008). Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Strains from Agricultural Waste Products. – *Appl Biochem Biotechnol*. No. 148, pp. 245-256.
- Kumar, P.** (2019). LYOPHILIZATION: AN IMPORTANT FORMULATION TECHNIQUE. – *International Journal of Research – GRANTHAALAYAH*. Vol. 7, pp. 11-15.
- Kumar, V., Joshi, V.** (2016). Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. - *Intl. J. Food. Ferment. Technol*. No. 6, pp. 13-24.
- Kupletskaya, M. B., Netrusov, A. I.** (2011). Viability of Lyophilized Microorganisms after 50Year Storage. – *Mikrobiologiya*. No. 6, pp. 850-853.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., Basehoar- Powers, E.** (2001). *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporogenous yeast from 'Kombucha tea'. – *FEMS Yeast Res*. No. 2, pp. 133-138.
- Laureys, D., Britton, S. J., Clippeleer, J.** (2020). Kombucha Tea Fermentation: A Review. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. Vol. 78, No. 3, pp. 165-174.
- Lavasani, P. S., Motevaseli, E., Shirzad, M., Modarressi, M. H.** (2017). Isolation and identification of *Komagataeibacter xylinus* from Iranian traditional vinegars and molecular analyses. – *IRAN. J. MICROBIOL*. No. 6, pp. 338-347.
- Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H., Escalante-Aburto, A.** (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. - *CyTA - Journal of Food*. No. 1, pp. 390-399.
- Logan, N. A., De Vos, P.** (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes*. Volume Three. (2nd Ed). New York: Springer. 1422 p.
- Lorentz, R. H., Ártico, S., Silveira, A. B., Einsfeld, A., Corção, G.** (2006). Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. – *Letters in Applied Microbiology*. No. 43, pp. 541-547.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Djurić, M. S., Kolarov, L. A., Klačnja, M. T.** (2005). Batch fermentation of black tea by kombucha: a contribution to scale-up. – *APTEFF*. No. 36, pp. 221-229.
- Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M.** (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. - *Food Chemistry*. No. 3, pp. 1039-1045.
- Mamlouk, D., Gullo, M.** (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. – *Indian J Microbiol*. Vol. 53, No. 4, pp. 377-384.
- Maneesri, J., Masniyom, P., Wongsadaluk, W.** (2011). Production of *Acetobacter aceti* Starter Powder by Low-Temperature Thermal Drying. – *The 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Systems Biotechnology: Quality & Success*. Pp. 190-192.

- Markov, S., Svetiković, Bukvić, B.** (2006). Use of tea fungus isolate as starter culture for obtaining of kombucha. - *Annals of the faculty of engineering hunedoara*. No. 3, pp. 73-78.
- Marsh, A. J., O' Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., Cotter, P. D.** (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. – *Food Microbiology*. No. 38, pp. 171-178.
- May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., Aktipis, A.** (2019). Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. – *PeerJ*. No. 7, pp. 1-22.
- Miyakawa, I., Nakahara, A., Ito, K.** (2012). Morphology of mitochondrial nucleoids, mitochondria, and nuclei during meiosis and sporulation of the yeast *Saccharomyces ludwigii*. – *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 58, pp. 43-51.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., Vesey, G.** (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. - *Journal of Microbiological Methods*. No. 66, pp. 183-193.
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., Omidifar, N., Bahrani, S., Mazraedoost, S.** (2020). Recent Progress in Chemical Composition, Production, and Pharmaceutical Effects of Kombucha Beverage: A Complementary and Alternative Medicine. – *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Pp. 1-14.
- Muhialdin, B., J., Osman, F. A., Muhamad, R., Che Wan Sapawi, C. W. N. S., Anzian, A., Voon, W. W. Y., Meor Hussin, A. S.** (2019). Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. – *International Food Research Journal*. No. 2, pp. 481-487.
- Mukadam, T. A., Punjabi, K., Deshpande, S. D., Vaidaya, S. P., Chowdhary, A. S.** (2016). Isolation and Characterization of Bacteria and Yeast from Kombucha Tea. – *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. No. 6, pp. 32-4.
- N'Guessan, F. K., Coulibaly, H. W., Alloue-Boraud, M. W. A., Cot, M., Djé, K.M.** (2016). Production of freeze- dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo. – *Food Science & Nutrition*. No. 4, pp. 34-41.
- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Destain, J., Guiro, A. T., Thonart, P.** (2009). Vinegars of the World: Preservation of Vinegar Acetic Acid Bacteria. Springer, Milano. Pp. 61-71.
- Ndoye, B., Weekers, F., Diawara, B., Guiro, A. T., Thonart, P.** (2007). Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. – *Journal of Food Engineering*. No. 79, pp. 1374-1382.
- Nyanga, L. K., Nout, M. J. R., Smid, E. J., Boekhout, T., Zwietering, M. H.** (2012). Yeasts preservation: alternatives for lyophilisation. – *World J Microbiol Biotechnol*. No. 28, pp. 3239-3244.



- Pa'e, N., Hamid, N. I. A., Khairuddin, N., Zahan, K. A., Seng, K. F., Siddique, B. M., Muhamad, I. I.** (2014). Effect of Different Drying Methods on the Morphology, Crystallinity, Swelling Ability and Tensile Properties of *Nata De Coco*. - *Sains Malaysiana*. No 5, pp. 767-773
- Palmfeldt, J., Hahn-Hägerdal, B.** (2000). Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. – *International Journal of Food Microbiology*. No. 55, pp. 235-238.
- Polo, L., Mañes-Lázaro, R., Olmeda, I., Cruz, L. E., Medina, Á., Ferrer, S., Pardo, I.** (2017). Influence of freezing temperatures prior freeze-drying on the viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. – *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 122, pp. 1603-1614.
- Ponsa, S., Bolzonella, D., Colon, J., Deshusses, M. A., Fonts, I., Gil-Lalaguna, N., Komilis, D., Lyberatos, G., Pérez-Elvira, S. I., Sánchez, J. L.** (2017). Innovative Wastewater Treatment & Resource Recovery Technologies: Impacts on Energy, Economy and Environment. Recovering energy from sludge. IWA Publishing. Pp. 325-354.
- Portner, D. C., Leuschner, R. G. K., Murray, B. S.** (2007). Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. – *Cryobiology*. No. 54, pp. 265-270.
- Prakash, O., Nimonkar, Y., Shouche, Y. S.** (2013). Practice and prospects of microbial preservation. – *FEMS Microbiol Lett*. No. 339, pp. 1-9.
- Prudnikova, S., Shidlovsky, I. P.** (2017). The New Strain of Acetic Acid Bacteria *Komagataeibacter xylinus* B-12068 – Producer of Bacterial Cellulose for Biomedical Applications. – *Journal of Siberian Federal University. Biology*. No. 10, pp. 246-254.
- Ramadani, A. S., Abulreesh, H. H.** (2010). Isolation and Identification of Yeast Flora in Local Kombucha Sample: AL NABTAH. - *Umm Al-Qura Univ. J. App. Sci*. No. 1, pp. 42-51.
- Rangaswami, B. E., Vanitha, K. P., Hungund, B. S.** (2015). Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. – *International Journal of Polymer Science*. Pp. 1-8.
- Reva, O. N., Zaets, I. E., Ovcharenko, L. P., Kukharensko, O. E., Shpylova, S. P., Podolich, O. V., Vera, J.-P., Kozyrovska, N. O.** (2015). Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. - *AMB Express*. No. 5, pp. 35.
- Rühs, P. A., Storz, F., Gómez, Y. A. L., Haug, M., Fischer, P.** (2018). 3D bacterial cellulose biofilms formed by foam templating. - *npj Biofilms and Microbiomes*. No. 4, pp. 1-6.
- Santos, R. A. C., Berretta, A. A., Barud, H. S., Ribeiro, S. J. L, González-García, L. N., Zucchi, T. D., Goldman, G. H., Riaño-Pachón, D. M.** (2014). Draft Genome Sequence of *Komagataeibacter rhaeticus* Strain AF1, a High Producer of Cellulose, Isolated from Kombucha Tea. – *Genome Announc*. No. 2.

- Sathishkumar, M., Swaminathan, K., Jayabalan, R., Yun, S.- E.** (2009). Hepatoprotective and Curative Properties of Kombucha Tea Against Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity. – *J. Microbiol. Biotechnol.* No. 19, pp. 397-402.
- Seki, S., Kleinhans, F. W., Mazur, P.** (2019). Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: Predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry. – *Cryobiology*. No. 58, pp. 157-165.
- Sengun, I. Y., Karabiyikli, S.** (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. – *Food Control*. Vol. 22, pp. 647-656.
- Seto, A., Saito, Y., Matsushige, M., Kobayashi, H., Sasaki, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T. Yoshinaga, F., Ueda, K., Beppu, T.** (2006). Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*. – *Appl Microbiol Biotechnol.* No. 73, pp. 915-921.
- Sharma, R., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Jaiswal, P., Sharma, A., Bisen, P. S.** (2014). Standardization of lyophilization medium for *Streptococcus thermophilus* subjected to viability escalation on freeze drying. – *Microbiology Research*. Vol. 5, pp. 1-3.
- Smith, D., Stackebrandt, E., Ryan, M. J.** (2008). Encyclopedia of Life Sciences Support: The ex situ conversation of microorganisms: aiming at a certified quality management. EoLSS. 30 p.
- Steels, H., James, S. A., Bond, C. J., Roberts, I. N., Stratford, M.** (2002). *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*. – *FEMS Yeast Research*. No. 2, pp. 113-121.
- Zeng, M., Roig, A., Laromaine, A.** (2014). Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. – *Cellulose*. No. 21, pp. 4455-4469.
- Zhang, C. J., Zhao, J. C., Wang, L., Zhu, P.** (2011). Effect of Drying Methods on Structure and Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Films. – *Advanced Materials Research*. Vols. 239-242, pp. 2667-2670.
- Zhao, Z., SuI, Y., Wu, H., Zhou, C., Hu, X., Zhang, J.** (2018). Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. – *Emirates Journal of Food and Agriculture*. No. 30, pp. 732-741.
- Zubaidah, E., Yurista, S., Rahmadani, N. R.** (2018). Characteristic of physical, chemical, and microbiological kombucha from various varieties of apples. – *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. No. 131, pp. 1-8.
- Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J.** (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. – *International Journal of Food Microbiology*. No. 95, pp. 119-126.
- Teuber, M. Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U.** (1995). Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. – *System. Appl. Microbiol.* No. 18, pp. 590-594.

- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R.** (2020a). Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in Kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. – *Foods*. No. 9, pp. 1-25.
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R.** (2020b). Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. – *Compr Rev Food Sci Food Saf*. No. 19, pp. 2050-2070.
- Velićanski, A., Cvetović, D., Markov, S.** (2013). Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. – *Romanian Biotechnological Letters*. No. 1, pp. 8034-8042.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.- P., Taillandier, P.** (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. – *Journal of Food Science*. No. 3, pp. 580-588.
- Volova, T. G., Prudnikova, S. V., Sukovaty, A. G., Shishatskaya, E. I.** (2018). Production and properties of bacterial cellulose by the strain Komagataeibacter xylinus B-12068. - *Applied Microbiology and Biotechnology*. No. 102, pp. 7417-7428.
- Wang, W., Chen, M., Wu, J., Wang, S.** (2015). Hypothermia protection effect of antifreeze peptides from pigskin collagen on freeze-dried Streptococcus thermophiles and its possible action mechanism. – *LWT - Food Science and Technology*. No. 63, pp. 878-885.
- Wang, Y., Liu, H., Peng, Y., Tong, L., Feng, L., Ma, K.** (2018). Characterization of the diethyl phthalate-degrading bacterium Sphingobium yanoikuyae SHJ. – *Data in Brief*. Vol. 20, pp. 1758-1763.
- Wessman, P., Håkansson, S., Leifer, K., Rubino, S.** (2013). Formulations for Freeze-drying of Bacteria and Their Influence on Cell Survival. – *Journal of Visualized Experiments*. No. 78, pp. 1-5.
- Wiegand, C., Klemm, D.** (2006). Influence of protective agents for preservation of *Gluconacetobacter xylinus* on its cellulose production. – *Cellulose*. No. 485.
- Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T.** (2010). Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function. - *Appl Biochem Biotechnol*. No. 2, pp. 446-455.
- Yapar, K., Cavusoglu, K., Oruc, E., Yalcin, E.** (2010). Protective effect of kombucha mushroom (KM) tea on phenol-induced cytotoxicity in albino mice. – *Journal of Environmental Biology*. No. 5, pp. 615-621.
- Yassunaka, N., Mandarino, J. M. G., Rosa, M. F., Catarino, R. P. F., Gomes, R. J., Andrade, T., Spinosa, W. A.** (2018). Photo-stimulation of Komagataeibacter xylinus ATCC 700178 for production of bacterial cellulose using light-emitting diodes (Leds). Vol. 2.

- Yongxiang, Y, Zheng, Z., Yingeng, W., Meijie, L., Bin, L., Liangyi, X.** (2017). Optimization of Protectant, Salinity and Freezing Condition for Freeze-Drying Preservation of *Edwardsiella tarda*. – *J. Ocean Univ. China*. No. 5, pp. 831-839.
- Yu, X., Atalla, R. H.** (1996). Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. - *International Journal of Biological Macromolecules*. No. 19, pp. 145-146.

**LISAD**

## Effect of simultaneous inoculation of commercial yeast starter cultures on Kombucha fermentation

M. Abel and H. Andreson\*

Estonian University of Life Sciences, Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Chair of Food Science and Technology, Kreutzwaldi 56/5, EE51014 Tartu, Estonia

\*Correspondence: [helena.andreson@emu.ee](mailto:helena.andreson@emu.ee)

**Abstract.** Kombucha – a spontaneously fermented tea beverage, produced by SCOBY (a symbiont of bacteria and yeasts), has become popular in recent years. Its functional properties and features for industrial production and treatment remain largely unknown, however. Our aim of using additional yeast cultures during the primary fermentation was to modify and ultimately improve the sensory properties of the kombucha beverage. During five fermentation experiments the total viable count (TVC) of microbes was determined both in Kombucha and SCOBY samples. The first four fermentation experiments were conducted to stabilize the growth of SCOBYs that were initially of different origin. The last (5<sup>th</sup>) fermentation contained the simultaneous inoculation of three different active *S. cerevisiae* cultures into the sweetened black tea together with the SCOBY and was followed by a sensory analysis. Two samples remained as control samples without additional yeast starter culture. The yeast starter cultures affected the microbial counts of Kombucha, but the effect on the microbial count of SCOBY was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). The Kombucha containing wine yeast culture had the lowest sensory quality, while Kombucha containing brewer's yeast had the most pleasant flavour and aroma. In conclusion, the simultaneous fermentation with commercial yeast cultures had a minor effect on the microbial counts in SCOBY when compared to the fermentation time, but all added cultures clearly modified the taste and aroma properties of the Kombucha drinks.

**Key words:** kombucha, SCOBY, tea, simultaneous fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*.

### INTRODUCTION

Kombucha is a beverage obtained by fermentation of sugar-sweetened tea with Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY) (Greenwalt et al., 2000; Jayabalan et al., 2011; Leal et al., 2018; Zhao et al., 2018). Kombucha has become very popular in recent years and both its production and consumption have increased. Especially the production of flavoured Kombucha drinks and the improvement of Kombucha's probiotic properties by the addition of lactic acid bacteria during simultaneous fermentation have recently gained more interest (Cvetković et al., 2019).

Kombucha and SCOBY contain acetic acid bacteria (e.g. from genera *Acetobacter*, *Bacterium*, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Komagataeibacter*), lactic acid bacteria (e.g. *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus satsumensis*, *Lactobacillus nagelii*) and yeasts (e.g. from genera *Brettanomyces*,



*Candida*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Zygotorulaspora*, *Pichia*, *Torula*, *Torulaspora*, *Torulopsis*) (Kozaki et al., 1972; Jankovic & Stojanovic, 1994; Markov et al., 2001; Dogan et al., 2002; Teoh et al., 2004; Jayabalan et al., 2010; Yapar, 2010; Reva et al., 2015; Coton et al., 2017) that live in tight symbiosis. The microbial species in different SCOBYs and Kombuchas may vary and due to this it is not possible to identify a uniform microbial community (Jayabalan et al., 2014). The most important acetic acid bacterium in Kombucha is *Komagataeibacter xylinus*, which synthesizes cellulose during fermentation (Jayabalan et al., 2010). The cellulose appears as a thin film on the surface of the tea solution and cells of other bacteria and yeasts attach to it (Jayabalan et al., 2010).

To make Kombucha, tea leaves are first put into a container, then hot boiled water is added and sucrose is dissolved in this hot tea beverage. Traditionally black tea is used for making Kombucha, but other teas can also be used – e.g. white tea, green tea, oolong tea and different herb teas (thyme, mint, sage, lemon balm, echinacea) (Markov et al., 2001; Malbaša et al., 2002; Markov et al., 2006; Jayabalan et al., 2010; Velićanski et al., 2013; Adzadogo, 2015). The sugared tea beverage is then cooled down to room temperature and SCOBY is finally added to start the fermentation process (Teoh et al., 2004; Malbaša et al., 2005; Vázquez-Cabral et al., 2014; Leal et al., 2018). The container used for growing SCOBY is covered with paper or other suitable material to prevent airborne microbes or insects from getting into the drink (Dutta & Paul, 2019). To obtain a pleasant sour beverage, primary fermentation is stopped once the titratable acidity has been reached 44.5 g L<sup>-1</sup> (Velićanski et al., 2013).

Fermented Kombucha beverage contains alcohols, aldehydes, ketones, esters, amino acids, tannins, terpenoids, saponins, flavonoids, phenols, alkaloids, CO<sub>2</sub>, enzymes, catechins, caffeine and other compounds (Adzadogo, 2015; Kumar & Joshi 2016). It is claimed that the chemical composition, mainly polyphenols and secondary metabolites formed during fermentation of Kombucha, add a therapeutic effect to the beverage (Watawana et al., 2015). Malbaša et al. (2011) and Watawana et al. (2015) state that Kombucha helps in improving digestion, gives relief against arthritis, prevents microbial infections, helps in combating cancer and removes toxic substances from the body.

Kombucha is described as a refreshing and slightly sweet-sour beverage whose taste is similar to that of effervescent apple cider (Jayabalan et al., 2014; Kumar & Joshi, 2016). After a short fermentation time, the beverage should acquire a pleasant fruity and sour taste, which tends to become slightly vinegary during prolonged fermentation (Reiss, 1994; Jayabalan et al., 2014). The taste of Kombucha depends on the concentration levels of residual sugar, carbon dioxide and organic acids (especially the concentration of acetic and gluconic acid) (Leal et al., 2018). Acetic acid gives the tea beverage an astringent and sour taste and gluconic acid gives it a mild taste (Chen & Liu, 2001). As a result of CO<sub>2</sub> formation, gas bubbles are formed in the tea solution (Mukadam et al., 2016).

Flavourings are usually added to Kombucha after primary and secondary fermentation have taken place in aerobic conditions or in a sealed or air-locked vessel (Bleam et al., 2016). Secondary fermentation may be carried out with or without SCOBY (Dutta & Paul, 2019). Whereas in an open vessel the new SCOBY is formed and a

domineering growth of acetic acid bacteria can be observed, in a sealed vessel more alcohol and lactic acid are produced (Bleam et al., 2016). To improve the probiotic properties of Kombucha lactic acid bacteria are used for the simultaneous fermentation (Nguyen et al., 2015; Cvetković et al., 2019).

There is a lack of scientific research about the effect of simultaneous fermentation on the sensory properties and microbial loads of Kombucha. Traditionally the taste properties of Kombucha are altered or improved during secondary fermentation by adding for example different juices to Kombucha. Modification of sensory properties with yeasts during primary fermentation would be an easier and more time-efficient method, however, especially in a commercial context, i.e. the food industries. Accordingly, the aim of this study was to evaluate the effect of different commercial *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures on the microbial abundance of both SCOBY and Kombucha as well as on the sensory properties of the fermented drinks.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

SCOBYs used in the experiments were originally obtained from two different households in Estonia: one was grown in green tea (TF 1, TF referring to ‘tea fungus’) and the second was grown in black tea (TF 2).

For simultaneous Kombucha fermentation the *Saccharomyces cerevisiae* commercial starter cultures for dry wine (Enovini dry wine yeast, Browin, Poland), dry cider (Dry cider yeast Ciderini Dry, Browin, Poland) and ale-type beer (BrewGo- O2, Browin, Poland) were obtained from the local market in Tartu, Estonia.

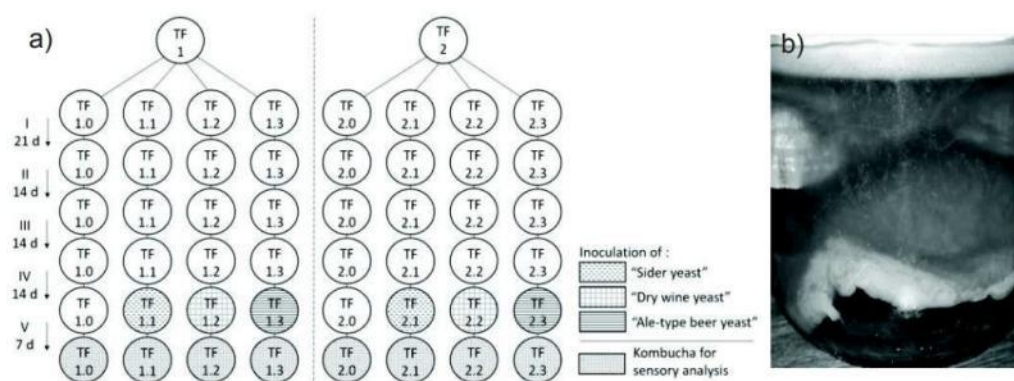
### Preparation of black tea

According to proportions suggested by AL-Kalifawi & Hassan (2013), tea solutions containing 5 g of black tea (Ceylon Jambo Grand black tea, Ranfer, Sri Lanka), 0.5 L of hot water and 50 g of sucrose (Polski Cukier, Poland) were prepared in eight sterilized 720 mL glass jars for each of the five fermentation test series. Tea leaves were removed after 30 minutes of soaking and the solutions were then left to cool in closed jars at room temperature (20–24 °C).

### Growing SCOBYs

Four circular pieces with a diameter of 2.8 cm each were cut out of both TF 1 and TF 2 ‘mother’ SCOBYs (Fig. 1, a) obtained from two different households. These samples were marked as TF 1.0, TF 1.1, TF 1.2, TF 1.3 and TF 2.0, TF 2.1, TF 2.2, TF 2.3, respectively. All pieces of SCOBYs were then inoculated in pre-made black tea solutions and grown at room temperature (20–24 °C) in glass jars (Fig. 1, b), covered with sterile gauze and fixed with a rubber band in a room with restricted access. In the following experiments, the daughter cultures of the SCOBYs from the previous test series (TS) were used. Before inoculation into the sugared tea beverage, an additional 10 g piece of the daughter SCOBY was taken for microbiological analysis.





**Figure 1.** a) Scheme of SCOBY sampling through the five test series of fermentation. TF-SCOBY; TF 1 and TF 2 – ‘mother’ SCOBYs previously grown in green or black tea, respectively; TF 1.0–1.3 and TF 2.0–2.3 – daughter SCOBYs originating either from TF 1 or TF 2, respectively, I–V – five test series, d – fermentation time in days. b) Photo of SCOBY growing in sugared black tea, taken by M. Abel.

The fermentation time varied through the different test series. Initially it was 21 days in the first test series for initial growth activation and then 14 days in the next three experiments that were performed for growth stabilization of SCOBYs. Shortening the duration of the fermentation process to 7 days for the final (V) test series prior to sensory analysis was important as the acidity levels of the Kombucha drink may become potentially harmful for consumers if its fermentation lasts more than 10 days (Nummer, 2013).

### Measuring the pH

During all experiments, the pH value was measured in sugared tea solutions before fermentation and in Kombucha (TFL 1.0–1.3 and 2.0–2.3, TFL referring to ‘tea fungus liquid’ according to the TF that was grown in it) after fermentation periods of 21, 14 or 7 days with a pH meter (SevenGo pro, Mettler Toledo, Switzerland).

### Addition of starter cultures for simultaneous Kombucha fermentation

At the beginning of the last (V) test series, *S. cerevisiae* starter cultures were added to the sugared black tea solutions in duplicates (Table 1, Fig. 1, a) together with the SCOBY according to instructions by the manufacturer. 1 g of yeasts were previously dissolved in sterile distilled water, pre-incubated and added to the black tea.

Yeast cultures were not added to samples TF 1.0 and TF 2.0 that remained control samples.

**Table 1.** *S. cerevisiae* starter cultures used for simultaneous Kombucha fermentation

Starter culture	Pre-incubation*	Samples
Yeast for making dry cider ‘Ciderini dry’	20 min, 25 °C	TF 1.1/ TF 2.1
Yeast for making dry wine ‘Enovini’	20 min, 30 °C	TF 1.2/ TF 2.2
Yeast for making ale-type beer ‘BrewGo- O2’	10 min, 35 °C	TF 1.3/ TF 2.3

\*Pre-incubation conditions of yeasts were conducted according to manufacturer’s instructions.

### **Sensory analysis of Kombucha**

Sensory analysis of Kombucha fermented for 7 days (containing wine, beer and cider yeast starter cultures as well as control samples) was carried out at the end of the last (V) test series. Ten randomly selected untrained assessors took part in the sensory analysis.

20 mL of each sample (TFL 1.0, TFL 1.1, TFL 1.2, TFL 1.3, TFL 2.0, TFL 2.1, TFL 2.2, and TFL 2.3) was given for each assessor. During the sensory analysis appearance, aromatic and taste properties, consistency and acceptability of the samples were assessed.

A descriptive method was used for the sensory analysis. The properties to be evaluated were selected by the authors through external observation, prior tasting and based on literature sources (Gramza-Michałowska et al., 2016; Neffe-Skocińska et al., 2017). During the evaluation, the assessors had the opportunity to point out additional tastes and aromas of each Kombucha beverage under review and graded predetermined properties of a beverage on an unstructured linear scale with a length of 10 cm. The grades on the linear scale ranged from 0 to 10 with 0 being the lowest and 10 being the highest grade. One point on the linear scale corresponded to 1 cm. The intensity of colour, aroma and taste was rated on a scale of not perceptible to intense. Flocculation and gaseousness were evaluated based on the presence of flakes and bubbles in the liquid. The acceptability of the beverages was evaluated on a scale 0–5 where 0 was considered as ‘unfit for consumption’ and 5 was considered as ‘very pleasant’ The evaluation results were averaged for each of the eight samples.

### **Enumeration of bacteria and yeasts**

For the microbial analysis of Kombucha, five ten-fold serial dilutions of a 1 mL sample were performed in 9 mL of 0.1% sterile peptone water. For the microbial analysis of SCOBY, a 10 g sample was placed in a sterile plastic bag with 90 mL of 0.1% sterile peptone water. The samples were then homogenized in a Stomacher®400 Circulator (Seward Ltd., England) at 300 rpm for 10 min, after which the ten-fold serial dilutions up to  $10^{-7}$  were finally prepared.

In order to enumerate the total viable count of bacteria and yeasts, 1 mL of dilutions were pour plated in duplicates in either PCA (Milk Plate Count Agar LAB 115, LabM Ltd., England) or in SDA (Sabouraud Dextrose Agar, Biolife, Italy), respectively. The PCA plates were then incubated for 72 h at 30 °C and SDA plates for 5 days at 25 °C. After the incubation, the colonies on the growth media were counted, averaged and transformed into log<sub>10</sub>-scale, displayed as log CFU mL<sup>-1</sup> (or g<sup>-1</sup>).

Additionally, the decimal dilutions of Kombucha and SCOBY were spread plated using a sterile 10 µl inoculation loop on Violet Red Bile Agar LAB 31 (LabM Ltd., England) followed by an incubation for 72 hours at 37 °C for the inspection of the presence of *coli*-like bacteria.

### **Statistical analysis**

Microsoft Office Excel 2013 was used to analyse the data collected during the experiments. To analyse variations in the observed parameters among the samples ANOVA (Analysis of Variance) and Student's *t*-test were used, where a *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.



## RESULTS AND DISCUSSION

### The pH value of Kombucha

Monitoring the pH value of Kombucha during the fermentation process is important, because if the pH has not reached  $\leq 4.2$  within 7 days, the Kombucha is either contaminated or the fermentation temperature is too low (Nummer, 2013). In both cases, the fermentation process must be restarted with a new SCOBY. If the pH of Kombucha drops below 2.5, it is unsafe for consumers, because long-term fermentation will raise the amount of acetic acid to a level which may adversely affect their health (Nummer, 2013). pH values of all Kombucha samples tested during experiments (Table 2) were safe for consuming, however.

**Table 2.** pH of Kombucha during five series of fermentation

TS (d)*	1.0	1.1	1.2	1.3	Mean <sup>1</sup>	2.0	2.1	2.2	2.3	Mean <sup>2</sup>
I (21)	2.66	2.67	2.86	2.71	2.73 $\pm$ 0.08	2.88	2.84	2.79	3.01	2.88 $\pm$ 0.08
II (14)	2.79	3	2.93	2.89	2.90 $\pm$ 0.08	2.69	2.82	2.83	2.73	2.77 $\pm$ 0.06
III (14)	2.91	2.8	2.84	2.84	2.85 $\pm$ 0.04	2.87	2.91	2.82	2.94	2.89 $\pm$ 0.05
IV (14)	2.88	2.94	3.05	2.79	2.92 $\pm$ 0.09	3.03	2.96	2.95	3.03	2.99 $\pm$ 0.04
V (7)	3.03	3.05	3.02	3.07	3.04 $\pm$ 0.02	3.39	3.17	3.06	3.12	3.19 $\pm$ 0.12

\*test series (duration in days); <sup>1</sup>averaged values of TFL 1.0–1.3 Kombucha samples, originating from TF 1 ‘mother’ SCOBY  $\pm$  standard deviation; <sup>2</sup>averaged values of TFL 2.0–2.3 Kombucha samples, originating from TF 2 ‘mother’ SCOBY  $\pm$  standard deviation.

The average pH of the initial sugared black tea solutions was 6.77, which is consistent with earlier scientific studies where their pH ranged from 6.62–7.8 (Blanc, 1996; Lončar et al., 2000; Velićanski et al., 2013; Gramza-Michałowska et al., 2016). The pH of the fermented solution, Kombucha, in the current study was 2.66–3.39 which in turn is in good concordance with previously reported pH ranges of 2.2–3.4 (Teoh et al., 2004; Gramza-Michałowska et al., 2016; Coton et al., 2017).

The analysis of the results showed that the history of previous growth conditions of SCOBY (samples TF 1.0–1.3 vs samples TF 2.0–2.3 originally grown in sweetened green or black tea, respectively) did not have a significant effect on the overall pH of the fermented solution ( $P > 0.05$ ). Comparison of the pH differences of samples TFL 1.0–1.3 and TFL 2.0–2.3 in different test series revealed that the pH of samples TFL 2.0–2.3 in TS II was statistically significantly lower than that of samples TFL 1.0–1.3 ( $P < 0.05$ ). There were no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) on the pH of Kombucha in the remaining test series, including the last fermentation (TS V) where the yeast starter cultures were included, however. Compared to other samples where the starter cultures were added, the pH was lowest in samples that contained wine yeast starter cultures, i.e. samples TFL 1.2 and TFL 2.2 (for which the pH was 3.02 and 3.06 respectively).

Similar to previous studies by Lončar et al. (2000), Velićanski et al. (2013) and Gramza-Michałowska et al. (2016), the pH of the Kombucha was found to be most affected by the length of time of the fermentation - the longer the fermentation time (7 vs 14 vs 21 days), the lower the pH value ( $P < 0.001$ ).

### Microbial dynamics in SCOBY and Kombucha

As SCOBYs used in experiments were of different origin, the first four fermentation series were conducted to stabilize the growth of SCOBYs. It was important to observe whether and how the SCOBY previously grown in green tea would adapt to the new growth conditions in black tea. To monitor the change in microbial loads over time, the total viable count (TVC) of bacteria and yeasts was determined in all Kombucha ( $n = 48$ ) and SCOBY ( $n = 48$ ) samples used during the experiments. An additional goal was to observe how inoculation with yeast starter cultures affected the microbial growth in SCOBY and Kombucha during the last test series.

The initial values of bacteria in two SCOBYs before fermentation experiments were  $7.15 \log \text{CFU g}^{-1}$  in 'mother' TF 1 and  $5.53 \log \text{CFU g}^{-1}$  in 'mother' TF 2. There was a statistically significant ( $P < 0.05$ ) decrease in bacterial loads in the two following fermentation series in samples taken from TF 1 (TF 1.0–1.3 in TS I and II) possibly due to the stress caused by the replacement of the green tea with the black tea (Table 3). The number of bacteria in this SCOBY line was back to the initial level ( $6.15$ – $7.26 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) by the end of the 3<sup>rd</sup> fermentation in sugared black tea solution. Such dynamics in bacterial counts was not seen in TF 2.0–2.3 samples and neither in TVC of yeasts where the initial numbers in TF 1 and TF 2 were  $5.2$  and  $6.11 \log \text{CFU g}^{-1}$ , respectively. Overall, the TVCs of microbes in SCOBY during the various stages of the fermentation process were similar with bacteria ranging between  $5.28$ – $8.81 \log \text{CFU g}^{-1}$  and yeasts ranging between  $5.08$ – $8.04 \log \text{CFU g}^{-1}$ . Our results were somewhat lower for bacteria, but well within the range of previous findings in which the counts of bacteria and yeasts in SCOBY were  $7.90$ – $9.11 \log \text{CFU g}^{-1}$  (Coton et al., 2017) and  $6.32$ – $7.40 \log \text{CFU g}^{-1}$  (Chen & Liu, 2001), respectively.

**Table 3.** Number of bacteria (B) and yeasts (Y) in SCOBY samples (TF 1.0–2.3) during five fermentation test series (I–V)

Sample	Microbes	Total viable count ( $\log \text{CFU g}^{-1}$ )*				
		I	II	III	IV	V
TF 1.0	B	5.43	5.80	7.26	7.18	6.68
	Y	5.62	5.56	7.11	7.20	6.65
TF 1.1	B	5.69	6.53	7.20	< 5.48	6.57
	Y	5.66	6.65	7.15	< 5.48	6.38
TF 1.2	B	5.90	5.98	5.83	7.72	7.95
	Y	5.92	5.82	5.74	7.73	7.85
TF 1.3	B	5.28	6.36	6.15	6.52	6.99
	Y	5.08	6.28	6.15	6.57	7.00
TF 2.0	B	6.68	7.23	5.72	6.04	8.11
	Y	5.65	7.18	5.75	5.91	8.04
TF 2.1	B	7.61	6.89	6.66	8.04	6.89
	Y	7.66	6.92	7.63	7.99	6.83
TF 2.2	B	5.72	6.15	6.86	7.61	8.81
	Y	5.58	6.08	6.88	7.64	7.92
TF 2.3	B	5.90	6.59	< 5.48	5.80	7.11
	Y	5.90	6.52	< 5.48	5.82	6.94

\*values < 5.48 refer to possible errors during the cultivation and were excluded from the analysis.



Interestingly, there was no statistically significant difference between the total bacterial counts of samples TF 1.0–1.3 when compared to the total bacterial counts of samples TF 2.0–2.3 in the respective test series, suggesting that the SCOBY, previously grown in green tea (TF 1.0–1.3), adapted rapidly to the new growth conditions. Yet, there was a significant variance ( $P < 0.05$ ) in the counts of bacteria and yeasts that grew slowly with each fermentation and was most significant after the final fermentation, however. Nevertheless, there was no statistical difference ( $P > 0.05$ ) in counts between the last two fermentations. This could be explained with either the effect of added yeast starter cultures or alternatively with the shorter fermentation period at the last fermentation.

In Kombucha the TVC of bacteria and yeasts was, like in SCOBY samples, similar to each other: 3.56–6.26 and 3.72–6.08 log CFU mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 4). In previous studies the TVC of bacteria and yeasts in Kombucha has been higher, ranging between 4.11–7.90 log CFU mL<sup>-1</sup> in bacterial (Jayabalan et al., 2007; Coton et al., 2017) and 5.97–7.90 log CFU mL<sup>-1</sup> in yeasts counts (Chen & Liu, 2001).

**Table 4.** Number of bacteria (B) and yeasts (Y) in Kombucha samples (TFL 1.0–2.3) during five fermentation experiments (I–V)

Sample	Microbes	Total viable count (log CFU mL <sup>-1</sup> )				
		I	II	III	IV	V
TFL 1.0	B	3.75	5.00	5.15	5.08	5.51
	Y	3.72	4.93	5.11	4.95	5.52
TFL 1.1	B	4.64	5.43	4.65	4.76	6.23
	Y	4.63	5.51	4.64	4.72	6.08
TFL 1.2	B	4.57	4.48	4.04	5.69	> 5.48
	Y	4.48	4.52	4.00	5.67	> 5.48
TFL 1.3	B	4.04	6.26	4.71	4.61	6.15
	Y	3.96	5.36	4.79	4.61	6.04
TFL 2.0	B	4.69	5.30	4.11	3.56	5.60
	Y	4.59	5.26	4.66	3.97	5.32
TFL 2.1	B	4.41	4.78	4.72	5.18	6.04
	Y	4.57	4.88	5.04	5.15	5.80
TFL 2.2	B	4.64	5.08	5.11	5.15	> 5.48
	Y	4.61	4.11	5.49	5.18	> 5.48
TFL 2.3	B	4.65	4.75	4.48	4.18	4.32
	Y	4.71	4.71	4.81	4.32	4.49

\*values > 5.48 refer to possible errors during the cultivation and were excluded from the analysis.

As in SCOBY samples, the dynamics of microbial counts during the five test series in Kombucha (TFL) 1.0–1.3 and 2.0–2.3 samples was similar ( $P > 0.05$ ). It was also noted by Kaewkod et al. (2019) that the total counts of bacteria and yeast cells in Kombucha prepared from either green or black tea were not significantly different.

There was a significant increase ( $P < 0.05$ ) in microbial loads in the Kombucha samples when yeast starter cultures were added when compared to the previous two (TS III and IV) and the first (TS I) fermentation. In addition, there was a statistically significant increase ( $P < 0.05$ ) in counts of bacteria and yeasts at the end of the second fermentation. Again, these results could be explained by the effect of the shortened

fermentation time from 21 to 14 and then to 7 days and/or with the simultaneous fermentation with added yeast cultures.

### **Sensory analysis of Kombucha**

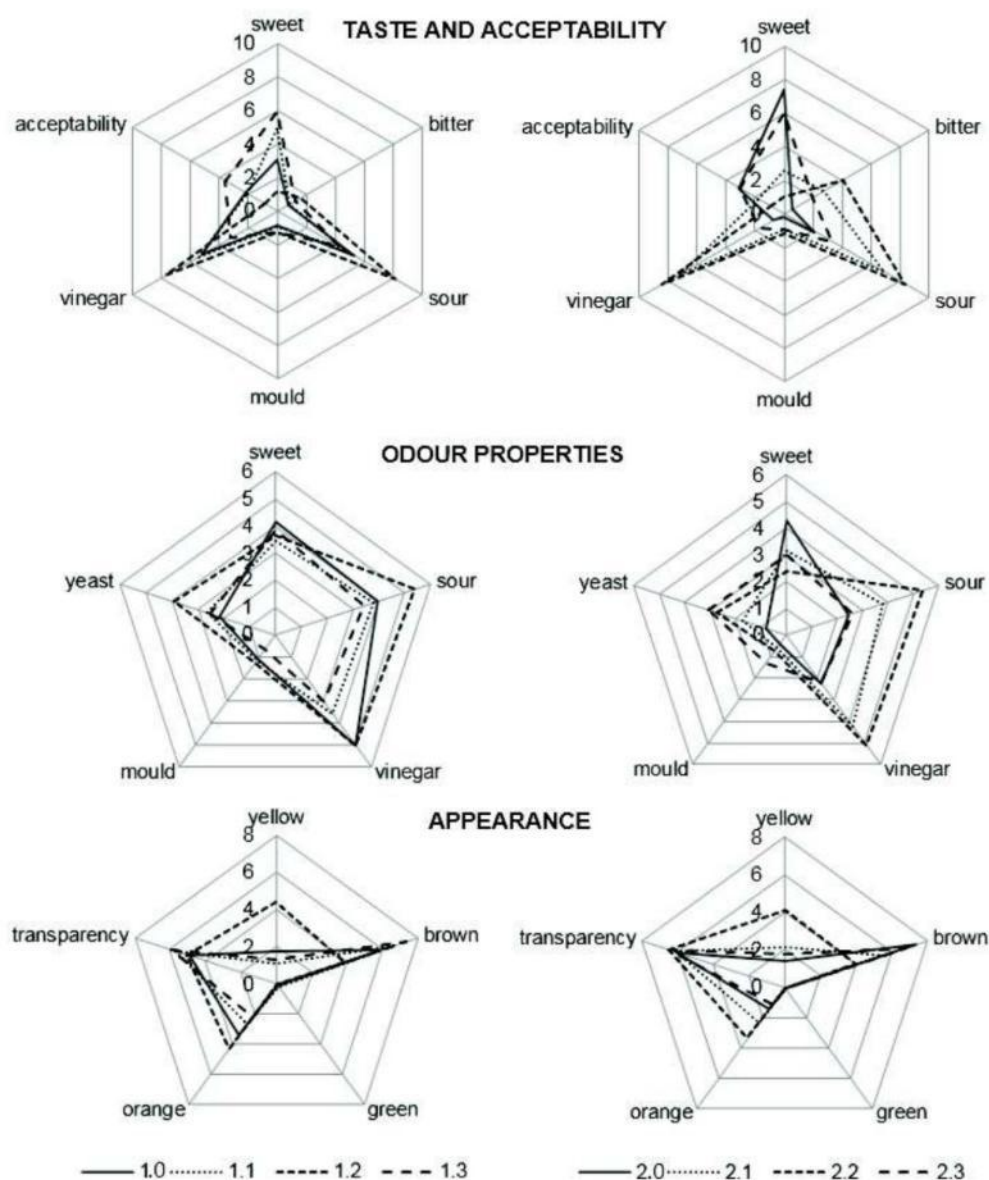
In this study the effect of different *S. cerevisiae* starter cultures on the organoleptic properties of Kombucha was evaluated by sensory analysis. For that purpose, first initial four fermentations were carried out to stabilize the entire fermentation process by giving time for SCOBY, obtained from different households, to adapt to the new growth environment and treatments. To ensure the safety of the assessors during the consumption of Kombucha, absence of *coli*-like bacteria both in Kombucha and in SCOBY was tested prior to the first and then for the two last fermentation(s). The commercial yeast cultures were added together with SCOBY to the black tea solutions to start the 5<sup>th</sup> fermentation experiment (TS V). To our knowledge, Kombucha fermentation has not yet been carried out in this way before. To improve the probiotic properties of Kombucha, lactic acid bacteria have been added to the black tea solution during the first fermentation with SCOBY (Nguyen et al., 2015; Cvetković et al., 2019); the flavour of the Kombucha has also been improved by means of the second fermentation.

During the sensory analysis, the appearance, taste, aroma and overall acceptability of the Kombucha drinks were evaluated. The results show that yeasts added to the black tea solutions had different effects on the properties of the Kombucha. The characteristics of the taste were most influenced by the different yeasts. Samples TFL 1.2 and TFL 2.2 to which wine yeast was added, had the most vinegary and sour taste ( $P < 0.05$ ). This sensory result was supported by their low pH values (pH was 3.02 and 3.06 respectively). In contrast, samples TFL 1.3 and TFL 2.3, to which brewer's yeast was added, had a much sweeter taste than the rest of the samples (with the exception of sample TFL 2.0, which was assessed to be the sweetest sample) ( $P < 0.05$ ) and thus a less sour and vinegary taste than the samples with cider and wine yeasts (TFL samples 1.1, 2.1 and 1.2, 2.2) ( $P < 0.05$ ).

Most of the beverages tested had sweet, sour and vinegary taste (Fig. 2). Traces of mould and a slight bitterness were also perceived in all of the samples. Honey flavours were also detected. Previously, Neffe-Skocińska et al. (2017) noted the taste of tea, lemon and sour tastes in their study, a sensory notion supported by Gramza-Michałowska et al. (2016), who noted that sweet, sour and citrus flavours were most evident in Kombucha. In addition, Gramza-Michałowska et al. (2016) also found that their Kombucha samples had a slight taste of tea and beer.

The overall acceptability of Kombucha (as part of the sensory evaluation) was considered low (in average  $\pm$  SD, the rating was  $2.19 \pm 1.44$ ) (Fig. 2). Most of the samples (27.9%) were evaluated with a grade 1 (on a scale of 0–5). The most acceptable Kombucha beverage was sample TFL 1.3 to which brewer's yeast was added ( $P < 0.05$ , but the difference was not statistically significant when compared to samples TFL 2.0 and 2.3), while TFL samples 1.2 and 2.2, to which wine yeast was added, had the lowest acceptability ( $P < 0.05$ ). Samples TFL 1.2 and TFL 2.2 were described as being too sour and vinegary in taste. Gramza-Michałowska et al. (2016) found that traditionally fermented Kombucha samples evaluated in their experiment were of moderate acceptability.





**Figure 2.** Taste and acceptability, odour properties and appearance of Kombucha samples. TFL 1.0 & 2.0 (control samples), TFL 1.1 & 2.1 (added cider yeast), TFL 1.2 & 2.2 (added wine yeast) and TFL 1.3 & 2.3 (added brewer's yeast). Kombucha drinks in first column originate from SCOBY previously (pre experiments) grown in sugared green tea (TF 1) and drinks in second column originate from SCOBY always grown in sugared black tea (TF 2).

Sweet, sour and vinegar scents were the most noticeable fragrances (Fig. 2). In addition, the smell of yeast and apple were also perceived. In earlier studies, the most commonly perceived scents were those of tea, lemon, sour, acetic acid, yeast and beer (Gramza-Michałowska et al., 2016; Neffe-Skocińska et al., 2017).

All samples evaluated showed medium transparency (Fig. 2). The dominant colour of all the samples was brown ( $P < 0.05$ ), but orange and yellow were also perceived. An earlier study also found Kombucha to be brown in colour with amber and yellow (Gramza-Michałowska et al., 2016). The results show that added yeasts did not affect the external properties of the solutions. All samples to which *S. cerevisiae* was added (TFL 1.1, TFL 1.2, TFL 1.3, TFL 2.1, TFL 2.2 and TFL 2.3) were similar in appearance to control samples (TF 1.0 and TFL 2.0).

## CONCLUSION

The addition of commercial yeast cultures to Kombucha did not significantly affect the overall microbial count in SCOBY, but it affected the overall microbial count in Kombucha; however the length of time of the fermentation process might play a more essential role in this respect. Therefore, the interplay of different parameters during the simultaneous fermentation process should be further and more thoroughly studied. In this study it was shown that all added commercial yeast cultures modified the sensory properties of the individual Kombucha drink. Detailed research is further needed to explore the precise influence, the possible advantages as well as the optimal conditions for simultaneous inoculation of various microbial strains, including probiotics, to the Kombucha fermentation process.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** This work was supported by the Estonian University of Life Sciences research and development base financing (P170195VLTQ). The authors are thankful to Kersti Veske for her technical assistance in the laboratory and to Tom Jung for his language editing of this paper.

## REFERENCES

- Adzadogo, R.S. 2015. *Comparison of physicochemical properties and anti-microbial Activities of tea and cocoa-based kombucha*. University of Ghana. Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology. 60 pp. <http://197.255.68.203/handle/123456789/21380>
- Al- Kalifawi, E.J. & Hassan, I.A. 2013. Factors influence on the yield of bacterial cellulose of Kombucha (Khubdat Humza). *Baghdad Science Journal* **11**, 1420–1428.
- Blanc, P.J. 1996. Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*. **18**, 139–142.
- Bleam, W., Goode, R., McKinney, D., Sitzman, B. & Tempes, R. 2016. Teacher's guide for Kombucha: something's brewing. *ChemMatters* 2–22.
- Chen, C. & Liu, B. Y. 2001. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 834–839.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume- Labarthe, L., Fall, A., Daube, G. & Coton, E. 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* **93**.
- Cvetković, D., Ranitović, A., Savić, D., Joković, N., Vidaković, A., Pezo, L. & Markov, S. 2019. Survival of wild strains of lactobacilli during Kombucha fermentation and their contribution to functional characteristics of beverage. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **69**, 407–415.



- Dogan, N.M., Beyatli, Y. & Aslim, B. 2002. A study on the production of poly-beta-hydroxybutyrate by some eukaryotic microorganisms. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, pp. 11–17.
- Dutta, H. & Paul, S.K. 2019. *Production and Management of Beverages*. Woodhead publishing, Elsevier, pp. 259–288.
- Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Xindi, Y. & Gumienna, M. 2016. Research on the effect of culture time on the Kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **15**, 447–457.
- Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H. & Ledford, R.A. 2000. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection* **63**, 976–981.
- Jankovic, I. & Stojanovic, M. 1994. Microbial and chemical composition, growth, therapeutical and antimicrobial characteristics of tea fungus. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Mikrobiologija* **31**, 35–43.
- Jayabalan, R., Chen, P.-N., Hsieh, Y.-S., Prabhakaran, K., Pitchai, P., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Swaminathan, K. & Yun, S.E. 2011. Effect of solvent fractions of Kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells – Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology* **10**, 75–82.
- Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S. & Sathishkumar, M. 2014. A review on Kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**, 538–550.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S. & Swaminathan, K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. **102**, 392–398.
- Jayabalan, R., Sathishkumar, M., Malini, K. & Yun, S.-E. 2010. Biochemical characteristics of tea fungus produced during Kombucha fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 1–5.
- Kaewkod, T., Bovonsombut, S. & Tragoolpua, Y. 2019. Efficacy of Kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. *Microorganisms*. **7**, 700.
- Kozaki, M., Kitahara, K. & Koizumi, A. 1972. Microorganisms of Zoogloeal Mats Formed in Tea Decoction. *Food Hygiene and Safety Science* **1**, 89–96.
- Kumar, V. & Joshi, V. 2016. Kombucha: technology, microbiology, production, composition and therapeutic value. *Intl. J. Food. Ferment. Technol.* **6**, 13–24.
- Leal, J.M., Suárez, L.V., Jayabalan, R., Oros, J.H. & Escalante-Aburto, A. 2018. A review on health benefits of Kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA Journal of Food* **16**, 390–399.
- Lončar, E.S., Petrović, S.E., Malbaša, R.V. & Verac, R.M. 2000. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Nahrung*. **44**, 138–139.
- Malbaša, R.V., Lončar, E.S. & Kolarov, A. 2002. Tea fungus fermentation on a substrate with iron (II)- ions. *Acta periodica technologica* **33**, 143–149.
- Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Djurić, M.S., Kolarov, L.A. & Klačnja, M. T. 2005. Batch fermentation of black tea by Kombucha: a contribution to scale-up. *APTEFF*. **36**, 221–229.
- Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S. & Čanadanović-Brunet, J.M. 2011. Influence of starter cultures on the antioxydant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry* **127**, 1727–1731.
- Markov, S.L., Malbaša, R.V., Hauk, M.J. & Cvetković, D.D. 2001. Investigation of tea fungus microbe associations. I. The yeasts. *Acta periodica technologica*. **32**, 133–138.
- Markov, S., Svetiković & Bukvić, B. 2006. Use of tea fungus isolate as starter culture for obtaining of kombucha. *Annals of the faculty of engineering hunedoara* **3**, 73–78.

- Mukadam, T.A., Punjabi, K., Deshpande, S.D., Vaidya, S.P. & Chowdhary, A.S. 2016. Isolation and characterization of bacteria and yeast from Kombucha tea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **5**, 32–4.
- Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I. & Kołożyn-Krajewska, D. 2017. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA-Journal of Food* **15**, 601–607.
- Nguyen, N.K., Dong, N.T.N., Nguyen, H. T. & Le, P.H. 2015. Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of Kombucha. *Springerplus*. **4**, 91.
- Nummer, B.A. 2013. Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health* **76**, 8–11.
- Reiss, J. 1994. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **198**, 258–261.
- Reva, O.N., Zaets, I.E., Ovcharenko, L.P., Kukhareno, O.E., Shpylova, S.P., Podolich, O.V., Vera, J.-P. & Kozyrovska, N.O. 2015. Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. *AMB Express* **5**, 35.
- Vázquez-Cabral, Z., Sul, Y., Wu, H., Zhou, C., Hu, X. & Zhang, J. 2018. Flavour chemical dynamics during fermentation of Kombucha tea. *Emirates Journal of Food and Agriculture* **30**, 732–741.
- Teoh, A. L., Heard, G. & Cox, J. 2004. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **95**, 119–126.
- Vázquez-Cabral, B.D., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., González-Herrera, S.M., González-Laredo, R.F., Moreno-Jiménez, M.R. & Córdova-Moreno, I.T.S. 2014. Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with the Kombucha consortium under different processing conditions. *Nutrafoods* **13**, 169–178.
- Velićanski, A., Cvetović, D. & Markov, S. 2013. Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. *Romanian Biotechnological Letters* **18**, 8034–8042.
- Watawana, M.I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C.B. & Waisundara, V.Y. 2015. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *Journal of Chemistry*. 1–11.
- Yapar, K., Cavusoglu, K., Oruc, E. & Yalcin, E. 2010. Protective effect of kombucha mushroom (KM) tea on phenol-induced cytotoxicity in albino mice. *Journal of Environmental Biology* **5**, 615–621.

**Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning  
juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Maarja Abel,

sünniaeg 11.07.1997,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö  
Teeseene lüofiliseerimine ja lüofiliseeritud teeseene kasutamine *kombucha*  
starterkultuurina,

mille juhendaja(d) on Helena Andreson,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks  
kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega  
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor \_\_\_\_\_  
(allkiri)

Tartu, 24.05.2021

---

**Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Luban lõputöö kaitsmisele.

Helena Andreson \_\_\_\_\_  
(allkiri)

24.05.2021